



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

# TRANSPORTNÍ VLASTNOSTI AGARÓZOVÝCH HYDROGELŮ

TRANSPORT PROPERTIES OF AGAROSE HYDROGELS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

JAN VLASÁK

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. MARTINA KLUČÁKOVÁ,  
Ph.D.

BRNO 2015



Vysoké učení technické v Brně  
**Fakulta chemická**  
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

## Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	<b>FCH-BAK0951/2014</b>	Akademický rok: <b>2014/2015</b>
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	<b>Jan Vlasák</b>	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Chemie pro medicínské aplikace (2808R031)	
Vedoucí práce	<b>doc. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.</b>	
Konzultanti:		

### Název bakalářské práce:

Transportní vlastnosti agarózových hydrogelů

### Zadání bakalářské práce:

1. Rešerše na téma transportní vlastnosti agarózových hydrogelů.
2. Výběr metod pro studium transportních vlastností hydrogelů.
3. Vlastní experimenty.
4. Zhodnocení výsledků a závěr.

### Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2015

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

-----  
Jan Vlasák  
Student(ka)

-----  
doc. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.  
Vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
Děkan fakulty

## **ABSTRAKT**

Tato bakalářská práce se zabývá problematikou transportních procesů elektrolytů, kde jako difúzní sondy jsou použita jednoduchá organická barviva. Hlavní náplní práce je studium mobility vybraných difúzních sond v podobě jednoduchých organických barviv v hydrogelové matici na bázi termoreverzibilního lineárního polysacharidu – agarózy, který zde funguje jako semipermeabilní membrána. Jsou popsány difúzní procesy, které slouží k určení základních difúzních parametrů, jako jsou efektivní difúzní koeficient, zdánlivý difúzní koeficient, rozdělovací koeficient, koncentrace barviva v gelu a doba, za kterou dojde k difúzi skrze celou tloušťku gelu. Pozornost je věnována také prostředí, ve kterém jsou difúzní procesy realizovány (především s ohledem na gelovitý charakter vzorku), pórovitou strukturu a mechanické vlastnosti.

## **ABSTRACT**

This thesis deals with the transportation processes of electrolytes using simple organic dyes as diffuse probes. The main goal of the work concerns a study of a diffusion mobility of the selected probes being in a form of simple organic dyes in a hydro-gel matrix based on a thermo-reversible linear polysaccharide, i.e., agaroses, functioning as semi-permeable membranes. The thesis describe diffusion processes used for determination of the basic diffusion parameters such as an efficient diffusion coefficient, reputed diffusion coefficient, separating coefficient, concentration of the dye in a gel and the time needed for the diffusion going throughout the entire layer of the gel. Attention is paid also to the environment in which the diffusion processes are implemented (in particular in view of the gel-like samples), porousness of the structure and its mechanical properties.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Agarózový hydrogel, difúze, rhodamine 6G, methylenová modř, efektivní difúzní koeficient, zdánlivý difúzní koeficient, velikost pórů, ultrafialovo-viditelná spektroskopie, rozdělovací koeficient.

## **KEYWORDS**

Agarose hydrogel, diffusion, rhodamine 6G, methylene blue, effective diffusion coefficient, apparent diffusion coefficient, pore size, UV-visible spectroscopy, partition coefficient.

Vlasák Jan, *Transportní vlastnosti agarózových hydrogelů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 51 s. Vedoucí bakalářské práce Doc. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně, a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis studenta

*Poděkování: Na tomto místě bych rád poděkoval vedoucí mé bakalářské práce paní Doc. Ing. Martině Klučákové, Ph.D. za její čas v podobě konzultací, ochotu, rady a odborné vedení práce. Velké díky samozřejmě panu Ing. Jiří Smílkovi, který mě celou mou problematikou provázel ať už teoreticky nebo prakticky. Děkuji Fakultě chemické za vytvoření pracovních podmínek a možnost realizovat tuto práci. V neposlední řadě chci poděkovat své rodině a mým přátelům za podporu, bez které by tato práce nemohla vzniknout.*

## **OBSAH**

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>Teoretická část</b>	<b>8</b>
<b>2.1</b>	<b>Gely</b>	<b>8</b>
2.1.1	Klasifikace gelů	8
2.1.2	Reverzibilní (elastické) gely	9
2.1.3	Ireverzibilní gely	11
2.1.4	Vlastnosti gelů	12
<b>2.2</b>	<b>Agaróza</b>	<b>13</b>
<b>2.3</b>	<b>Historie zkoumání difúze</b>	<b>15</b>
<b>2.4</b>	<b>Difúze</b>	<b>16</b>
2.4.1	Fickovy zákony	17
2.4.2	Fickovy zákony v porézním prostředí	19
2.4.3	Jednoduché modely difúze	22
2.4.4	Metody pro stanovení difúzního koeficientu	24
2.4.5	Materiálová bilance difundující složky směsi	25
2.4.6	Difúzní cely	26
<b>2.5</b>	<b>Organická barviva</b>	<b>27</b>
2.5.1	Rhodamin a methylenová modř	27
<b>3</b>	<b>Současný stav řešené problematiky</b>	<b>29</b>
<b>4</b>	<b>Experimentální část</b>	<b>31</b>
<b>4.1</b>	<b>Použité chemikálie</b>	<b>31</b>
<b>4.2</b>	<b>Použité přístroje</b>	<b>31</b>
<b>4.3</b>	<b>Metodika přípravy agarózového hydrogelu</b>	<b>31</b>
<b>4.4</b>	<b>Difúzní experimenty</b>	<b>31</b>
<b>4.5</b>	<b>Charakterizace gelů</b>	<b>32</b>
<b>4.6</b>	<b>Difúzní cely</b>	<b>32</b>
<b>5</b>	<b>Výsledky a diskuze</b>	<b>33</b>
<b>5.1</b>	<b>Charakterizace hydrogelů</b>	<b>33</b>
<b>5.2</b>	<b>Difúzní experimenty</b>	<b>35</b>
<b>6</b>	<b>Závěr</b>	<b>43</b>
<b>7</b>	<b>Použitá literatura</b>	<b>44</b>
<b>8</b>	<b>Seznam zkratk a symbolů</b>	<b>50</b>
8.1	Použité symboly	50

## **CÍL PRÁCE**

Cílem bakalářské práce je stanovit hodnoty difúzních koeficientů organických barviv a jejich závislosti na koncentraci agarózového hydrogelu, která úzce souvisí s obsahem a velikostí pórů. Další důležitou charakteristikou je stanovení rozdělovacího koeficientu, času průchodu a koncentrace barviva v gelu.

## 1 ÚVOD

Bakalářská práce se zabývá vysoce diskutovanou problematikou transportních procesů. Jedná se o difúzi organického barviva přes různě koncentrovaný agarózový hydrogel. Veškeré látky mají tendenci přecházet z prostředí o vyšší koncentraci do prostředí o koncentraci nižší. Pro experimentální část práce byla zvolena metoda difúzních cel. Tato práce by mohla pomoci odlišit vliv struktury gelu a pórů od vlivu přídatku různých biopolymerů, jako jsou např. huminové látky. Průběh difúze v každé látce velmi závisí na skupenství. V plynu mají částice nejvyšší kinetickou energii, tudíž samotná difúze probíhá nejrychleji a to do okamžiku, kdy dochází k tzv. vyrovnání koncentrace původního a nového plynu v prostoru. V kapalinách se difúze projevuje jakýmsi „posouváním“ jednotlivých částic. Difúze již nezávisí jen na čase a teplotě, ale také na viskozitě a vzájemné rozpustnosti kapalin. Pro tuhé látky je jedinou možností, jak lze přenést hmotu, právě difúze. Děj závisí opět na čase teplotě, ale už ne na viskozitě, ale na velikosti difundujících atomů.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Gely

Jako gel označujeme disperzní systém, ve kterém jsou disperzní částice spojeny do trojrozměrné sítě, která prochází disperzním prostředím. Jak disperzní prostředí, tak i disperzní podíl jsou spojitě. Jakmile se disperzní částice spojí do síťové struktury, tak ztrácí schopnost nezávisle se pohybovat disperzním prostředím. Adhezi disperzních částic zde vyvolávají jak fyzikální, tak i chemické síly. Jakmile dojde k odstranění disperzního prostředí a tudíž k (vysušení gelu), vzniká systém, ve kterém již najdeme jen disperzní podíl. Takový gel se nazývá xerogel. Původní rosolovitý gel (ve kterém se nachází disperzní prostředí) se nazývá lyogel. Nejčastěji bývají disperzní částice, které se spojují do síťovité struktury gelu, koloidní velikosti, nicméně jsou známy i případy tvorby gelů v mikroheterogenních systémech (např. gely některých silikátů). O význam gelů a obecně procesu gelace v lékařství a biologii není pochyb. Jejich uplatnění spočívá v tom, že jak organizmy živočichů, tak i rostlin jsou tvořeny z velké části gely. Důležitým procesem technického charakteru je gelace vysokomolekulárních látek, která vede ke vzniku nekonečné trojrozměrné sítě (např. vláknová výroba). Čím větší je gelace, tím větší je hmotnost sítě a tím menší je množství rozpouštědla. Principu tvorby gelů se využívá i v oblasti potravinářství [1].

#### 2.1.1 Klasifikace gelů

Gely můžeme klasifikovat na základě různých faktorů.

Podle charakteru složení disperzního podílu na [2]:

- anorganické gely
- organické gely

Z hlediska typu disperzního prostředí [2]:

- hydrogely – disperzní prostředí je zde tvořeno kombinací gelu a vody
- organogely – disperzní prostředí zde tvoří gel a organická kapalina
- izogely – disperzní prostředí je monomerním disperzního podílu

Z hlediska přítomnosti, či absence rozpouštědla [3]:

- xerogely – v jejich struktuře nenajdeme rozpouštědlo
- lyogely – v jejich struktuře najdeme rozpouštědlo, jehož vysušením se tvoří xerogel

Posledním typem dělení je reakce xerogelu na přítomnost kapaliny [1]:

- **Gely reverzibilní** (elastické) – jak již název napovídá, jedná se o takové gely, které jsou schopny naprosté regenerace. Důsledkem vysoušení se jejich objem zmenšuje a přechází do tvaru kompaktních xerogelů, které mají schopnost přijímáním původního disperzního prostředí, nebo jiných kapalin, přecházet zpět do původního tvaru.



- **Gely ireverzibilní** (neelastické) – jsou gely, které mají schopnost při kontaktu s disperzním prostředím určité množství kapaliny adsorbovat, nicméně přejít do původního tvaru nedokážou.

### 2.1.2 Reverzibilní (elastické) gely

Sítě makromolekulárních řetězců se spojují v místech, které se nazývají uzly, uzlové body nebo uzlové oblasti. Takto spojené řetězce potom tvoří základní prostorovou strukturu reverzibilního gelu. Jsou známy dvě možnosti vzniku reverzibilních gelů. První z nich je prostá gelace z roztoků vysokomolekulárních látek a druhá z nich je botnání z xerogelu [2].

Prostou gelací mohou vznikat gely jak fyzikálního, tak i chemického charakteru. Vznik chemicky síťovaných gelů je také dvojího typu. Prvním z nich je vhodně uspořádaná polymerace monomerů a druhým z nich je zesíťování již hotových lineárních polymerů za přítomnosti vhodného síťovacího činidla (např. kaučuku) [3]. Gely s těmito vazbami mají pevnou strukturu. Jsou tvořeny nekonečnou trojrozměrnou síťovou strukturou [4]. Gely, které se při vysušení rozpouštědla (disperzního prostředí) mění na xerogely botnají, ale pouze do určité míry – zpět na původní roztok by se mohly dostat pouze porušením chemických vazeb, což by mělo za následek zánik i jiných vazeb než těch, které vznikly procesem gelace.

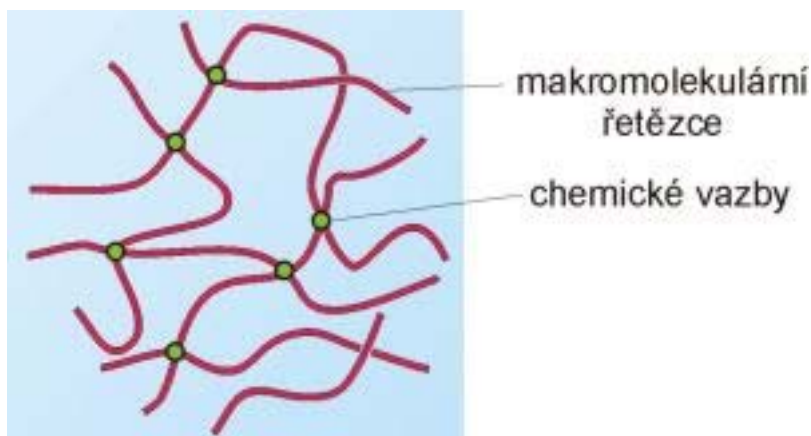
Fyzikálně síťované gely vděčí za spojování částí polymerních řetězců do uzlů fyzikálním silám Van der Waalovým, polárním silám a vodíkovým můstkům. Snížením afinity polymerního řetězce k rozpouštědлу, (snížení teploty, zvýšení koncentrace) vede ke sdružování mezi jednotlivými řetězci. Pokud je sdružování nepravidelné, vznikají fyzikálně síťované amorfní gely. Působení fyzikálních sil není jedinou možností tvorby gelu. Ke tvorbě gelů může docházet také důsledkem tepelného pohybu, kdy dochází k mechanickému propletení řetězců tzv. geometrickému síťování [3].

Samotná gelace závisí zejména na teplotě, koncentraci a pH [2] :

**vliv teploty** – zvýšením teploty se zvýší tepelný pohyb v gelu a naopak zmenší počet vazeb mezi makromolekulami. Zvýšení počtu vazeb mezi makromolekulami je pochopitelně vyvoláno snížením teploty a podporuje tak gelaci. Tím se dostáváme k termoreverzibilnímu chování některých gelů, jakož je například agaróza.

**vliv koncentrace** – zvýšení koncentrace podporuje gelaci, což se projevuje zvýšením četnosti srážek makromolekul, které jsou důsledkem zvýšení počtu vazeb v gelu.

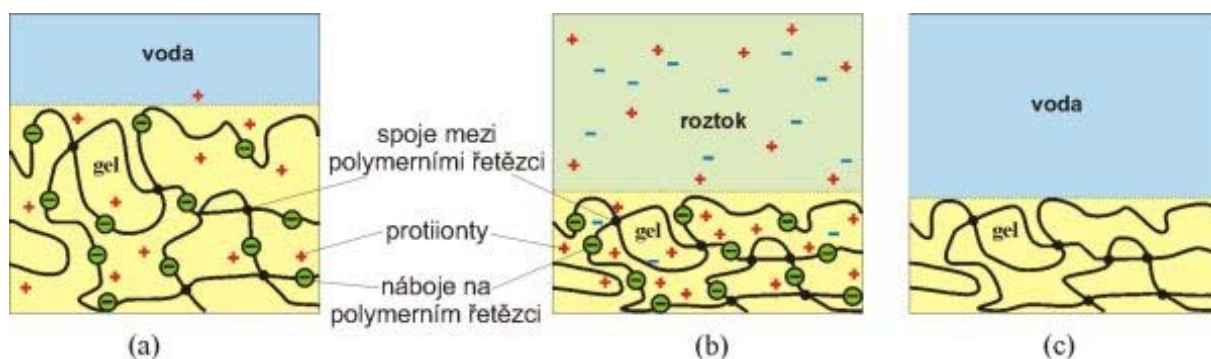
**vliv pH** – gelace bude nejúčinnější v oblasti izoelektrického bodu.



**Obrázek č. 1:** reverzibilní gel [1]

### ***Botnání***

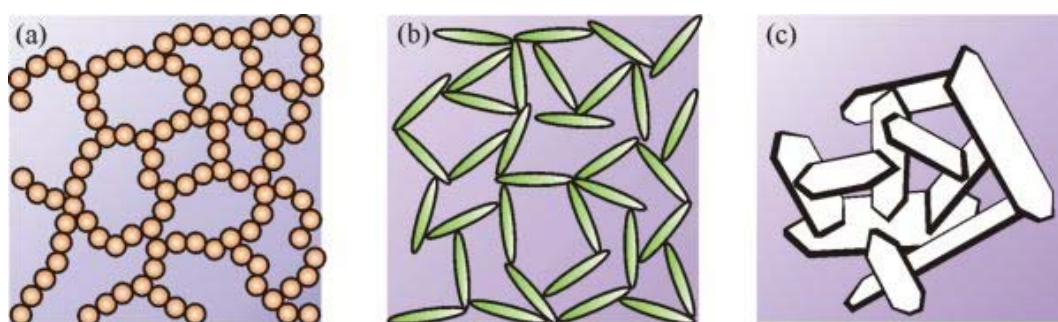
Je samovolný děj, při kterém je vznik lyogelu podmíněný schopností xerogelu pohltnout nízkomolekulární rozpouštědlo. Kapalina, která je pohlcena xerogelem tvoří disperzní prostředí. Dochází přitom k zvětšení jak objemu, tak i hmotnosti gelu. V případě, že bude xerogel botnat v nadměrném množství kapaliny a dojde k zastavení ve fázi lyogelu, mluvíme o tzv. omezeném botnání. V opačném případě, ve kterém se botnání nezastaví ve stavu lyogelu mluvíme o botnání neomezeném. Stupeň nabotnání  $Q$  popisuje botnání polymeru v kapalině. Bývá definován jako hmotnost kapaliny, která je pohlcena jednotkou hmotnosti suchého xerogelu nebo botnacím tlakem, což je nejnižší tlak, kterým je nutno působit na gel, aby se zastavilo botnání. V případě nižšího tlaku, než je botnací tlak, gel botná a při vyšším tlaku než tlak botnací, je již pohlcená kapalina z gelu vypuzována [3]. Obecně vykazují fyzikálně síťované gely termoreverzibilní chování. Toto chování není termodynamicky vratné, jako je tomu u krystalizace a tání čistých látek. Nemluvíme o jedné, přesně určené teplotě. Při ochlazování tuhne koloidní roztok v gel při tzv. teplotě tuhnutí (bodu gelace), při zahřívání gel přechází na sol při tzv. teplotě ztekucení, která je pro většinu gelů o 10 až 20 °C vyšší než teplota tuhnutí. Obě teploty závisejí na rychlosti chlazení nebo ohřívání i na koncentraci systému. Určení obou teplot je záležitost dohody, neboť gelace je postupný proces (zjišťují se např. jako teploty v okamžiku, kdy při naklonění sol nevytéká, resp. gel vytéká ze zkumavky) [1, 2].



**Obrázek č. 2:** Botnutí gelu vysokomolekulárního elektrolytu  
 (a) v čisté vodě; botnáci tlak se zvyšuje o osmotický tlak oddisociovaných protiiontů  
 (b) v roztoku nízkomolekulárního elektrolytu  
 (c) nedisociovaný gel stejné struktury v čisté vodě [3]

### 2.1.3 Ireverzibilní gely

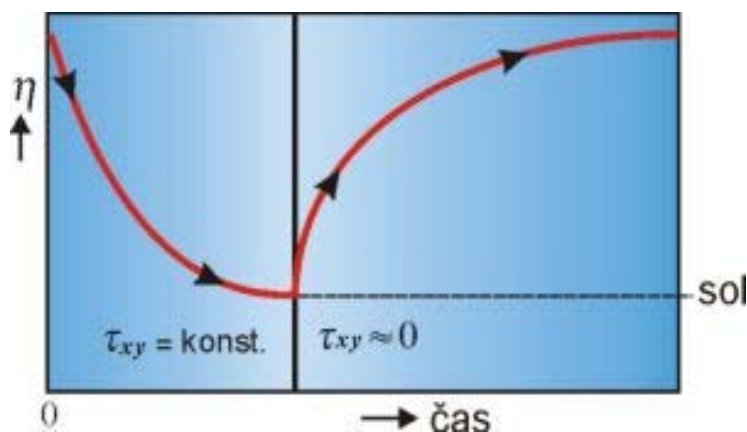
V případě, že vysušíme ireverzibilní gely, budou mít téměř stejný objem, jako původní lyogely, nicméně je stále pokládáme za porézní. Důvodem není botnutí, ale adsorpce velkého množství kapaliny. Dobrým příkladem, který splňuje tyto podmínky je silikagel. Ireverzibilní gely vznikají procesem gelace lyofobních solí. V případě, že dojde k částečnému narušení ochranné vrstvy disperzních částic, dojde k lehkému porušení povrchu (ztráta stability), který má za následek vzájemné spojování částic těmito místy za vzniku tzv. prostorové sítě. V mezerách prostorové sítě, je uzavřeno disperzní prostředí. Důležitá je minimální hodnota koncentrace disperzního podílu. Pokud se dostaneme pod tuhle hranici, je možná už jen koagulace [3]. Tomu, aby nám gel lépe vznikal, pomáhá zmenšení rozměrů částic za konstantní hmotnosti disperzního podílu. Důležitou roli ovšem hraje i tvar částice. Nejvhodnějšími částicemi pro tvorbu gelu jsou jednoznačně anizometrické částice, což jsou částice, kde převládá jeden nebo dva z jejich rozměrů. Elektrické dvojvrstvy jsou nejméně vyvinuty na hranách a hrotech, což jsou místa, kde dochází ke spojování částic. Pro tvorbu gelu je navíc dostačující jen malá koncentrace disperzního podílu a je tak snazší odlišit podmínky gelace a koagulace. Posledním a velmi důležitým faktorem pro tvorbu gelu je teplota, která ovlivňuje i pozdější chování a vlastnosti daného gelu [1] [2].



**Obrázek č. 3:** Ireverzibilní gel (a) s izometrickými částicemi, (b) s jehlicovitými částicemi, (c) s destičkovitými částicemi [2]

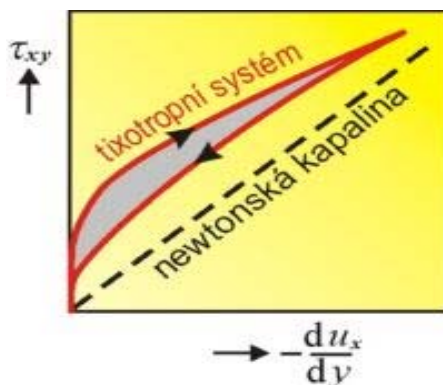
### 2.1.4 Vlastnosti gelů

Ačkoliv je disperzní prostředí gelů spíše kapalného charakteru, svými mechanickými vlastnostmi se podobá charakteru tuhému. Pro gel je působení tzv. tečného napětí naprosto netečné do doby, než je překonána tzv. kritická elasticita. Po dosažení této hodnoty vykazuje gel prvky chování spíše elastického tuhého tělesa. Velmi elastické jsou gely, vykazující ve své struktuře spoje kovalentního charakteru. Tyto gely obsahují velmi malý počet vazeb. S rostoucím počtem vazeb se snižuje šance na změnu tvaru makromolekuly a takto vytvořená prostorová síť je potom stabilní. Jak reverzibilní, tak i ireverzibilní gely s fyzikálními spoji mohou vykazovat tixotropní chování [2]. Jedná se o nelineární snižování vizkozity v závislosti na tlaku, které se hojně využívá např. při natírání. Promícháním systému docílíme vysoké zdánlivé vizkozity, která bude s časem klesat. Pokud ovšem ponecháme gel v klidu, tak se vizkozita bude blížit své původní vysoké hodnotě viz (obrázek č. 4) [2].



**Obrázek č. 4:** Časová závislost zdánlivé vizkozity tixotropního systému [2]

V případě slabých sil poutajících disperzní částice do síťové struktury je možné gel prudkým protřepáním převést znovu na sol, jelikož dochází k porušení slabých vazeb mezi částicemi. Necháme-li ztekucený gel v klidu, dojde k regeneraci mezi vazbami a následné gelaci viz (obrázek č. 5) [2].

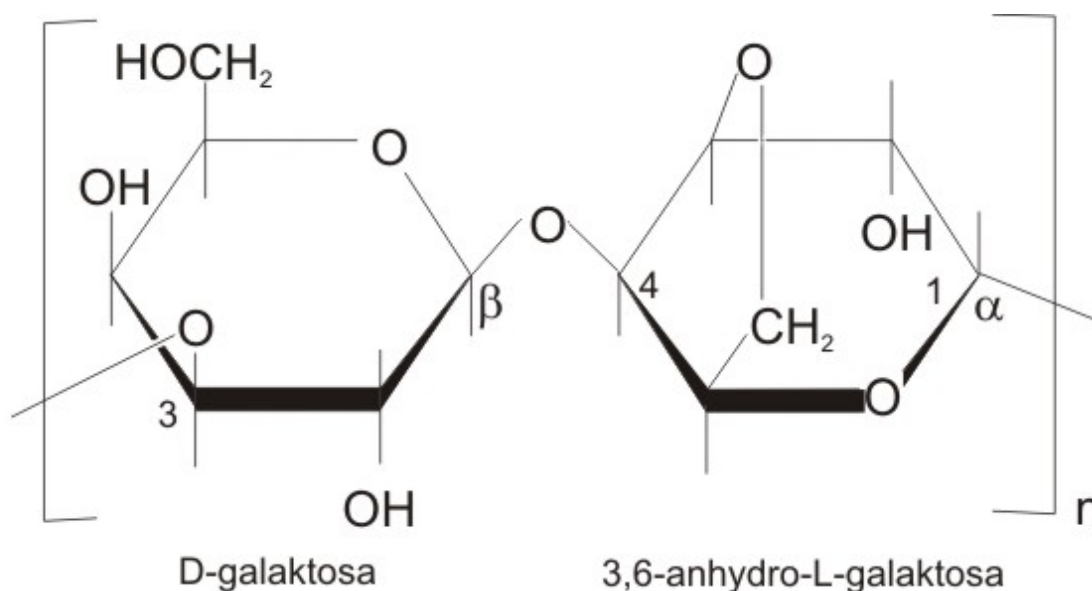


**Obrázek č. 5:** Průběh tokové křivky pro tixotropní a newtonskou kapalinu [2]

U gelů, v jejichž disperzním prostředí se nachází disociované nízkomolekulární elektrolyty zůstává elektrická vodivost velmi podobná vodivosti solu. Stejně tak i difuzivita nízkomolekulárních látek v gelu je jen nepatrně menší, než v solu ze kterého vznikl gel a to i přes to, že při gelaci prudce roste viskozita soustavy. Jelikož gely mají síťovitou strukturu, tak zabraňují negativním vlivům proudění a tepelných konvekci na jejich difuzivitu [1]. Spousta gelů, které se vyskytují jak v rostlinných, tak i v živočišných tělech vykazují anizotropii, která vychází z podmínek tvorby těchto gelů. Nerovnoměrná deformace a nerovnoměrná objemová kontrakce (při vysoušení) jsou hlavními příčinami anizotropie uměle připravených gelů. Dobrým příkladem tzv. nerovnoměrné objemové kontrakce je vysoušení želatiny na skleněné desce. Zde totiž může smršťování probíhat jen ve směru tloušťky filmu gelu a proto se makromolekuly želatiny orientují převážně rovnoběžně s plochou desky. Vlastnosti u těchto typů gelů, jako je změna lineárních rozměrů vzorku gelu při botnání, lom světla, pohlcování světla a dvojlom světla jsou různé v mnoha směrech. Čerstvé gely nejsou v termodynamické rovnováze a tudíž zde dochází k řadě samovolných jevů. Tento děj se nazývá stárnutí gelu a je to vlastně nárůst vztyčných bodů, čímž se smršťuje síťovitá struktura a s ní celý gel. Dochází k vytlačení malé části kapaliny, která již v tento moment nemá v gelu své místo. Tento děj se nazývá synerese a je typický pro právě zmíněné čerstvé gely [4]. Pro zvýšení synerese je zapotřebí buď zvýšení teploty a nebo přidavek elektrolytu [2].

## 2.2 Agaróza

Agar se získává z mořské červené řasy rodu *Rhodophyta*. Agaróza je mořský, lineární polysacharid, jehož základní strukturní jednotka je tvořena z D-Galaktosy a z 3,6-anhydro-L-galaktosy.



**Obrázek č. 6:** Struktura agarózy [5]

Agaróza je jak je zmíněno výše termoreverzibilní gel, obsahující tlusté svazky agarózových řetězců, které jsou u sebe drženy pomocí vodíkových můstků (velké póry držící vodu). Je

tvořena stále se opakujícími monomerními jednotkami agarobiózy. Agaróza je schopna přijmout velké množství vody a to díky dutině, kterou vytváří trojrozměrná struktura šroubovice s trojnásobně zalomenou osou. Skupiny těchto řetězců mohou také vytvářet dvojitou šroubovici, čímž vznikne stabilní gel [7]. Pomocí agarózového gelu můžeme dělit proteiny vertikálně i horizontálně. Agaróza není toxická a snadno se připravuje. Agarózové gely jsou stabilní a můžeme je uchovávat po dobu jednoho roku. Nevýhodou naopak je, že agaróza je přírodní produkt, a proto se jednotlivé šarže i od stejného výrobce mohou lišit a poskytovat odlišné výsledky [6].

Další vlastnost agarózy je to, že není zachována termodynamická rovnováha. Teplota ztekucení se liší od teploty gelace o cca 40 °C. Teplota ztekucení je v rozmezí od 85 – 95 °C, zatímco teplota gelace je podstatně nižší v oblasti od 35 – 42 °C. Další zajímavou vlastností je tzv. paměť gelu, která se projevuje následovně. Zahřejeme-li agarózu ve vodě na teplotu 85 °C získáváme roztok, který ochlazením na teplotu kolem 40 °C tuhne v gel. Pokud bychom opakovali tenhle proces znovu teploty už se budou trochu lišit (na roztok i na gel už se dostáváme při jiných teplotách. Důvodem je struktura agarózy (vodíkové můstky) [6].

Hlavním využitím agarózového gelu je bez pochyby elektroforetická separace. Konkrétně se jedná o elektroforézu nukleových kyselin (DNA), na bázi agarózového gelu. Pro svou velikost porů a dobrou pevnost gelu můžeme agarózu využít jako antikonvekční medium pro elektroforézu DNA velkých bílkovinových molekul. Uplatnění nachází např. i v hodnocení struktury potravin.

Na základě svých výborných vlastností se využívá i v řadě jiných odvětví. Jeho využití sahá i do oblasti spotřebního průmyslu: potravinářství, farmacie, biomedicínských aplikací a uplatňuje se i jako purifikační medium.

Princip hodnocení potravinářských výrobků je velice složitý. Porozumění molekulárním mechanismů není jednoduché a pro tyto účely byly stanoveny strukturní vztahy, které mohou pomoci vědcům při navrhování konkrétních struktur potravin. Mezi tzv. napodobovací testy patří populární instrumentální analýza Texture Profile (TPA) [7] a relativně nový Bicyclical, sloužící jako nástroj pro hodnocení textury (BITE master) [8], což byl pokus o simulaci mechanických pohybů kousání, nebo žvýkání. Smyslové vnímání a napodobovací instrumentální stanovení o“tvrdosti“ koreluje velmi dobře [9, 10, 11]. Jiné požadavky, jako například soudržnost a pružnost, už nekoreluje tak dobře [12, 13]. Cílem měření základní reologické vlastnosti není napodobovat lidské smyslové procesy, ale měření fyzikálních vlastností daného systému [14]. V reologických testech se pomocí reometru obvykle měří síly a deformace spojené s pozřením prvního sousta [15]. Potravinové biopolymerní gely mají podstatně méně složitou strukturu než tuhé potraviny a jsou proto užitečné pro mechanickou analýzu. Agarózový gel vděčí za svou nenáročnost v oblasti struktury vodíkovým vazbám, které tvoří celou jeho síť. Je tedy více než vhodný pro zkoumání strukturních funkčních vztahů. Cílem jejich studie je tedy stanovit správné reologické vztahy na základě agarózového gelu. Shama a Sherman [16] uvádí, že smykové rychlosti v ústech jsou v rozsahu 10 – 1000 SK1. V dalším výzkumu Shama a Sherman zjistili, že rychlost jakou je potrava požívána a jí odpovídající síla, která je na tenhle proces potřebná velice úzce souvisí s tvrdostí potravin [17]. Naproti tomu Bourne tvrdí, že rychlost žvýkání zůstává konstantní [18]. Studie Brown,

Eves, Ellison a Braxton, používající techniku elektromyografie (jedná se o biosignály v důsledku svalové aktivity) (nám říká, že lidé žvýkají většinu potravin rychlostí 0,2/s – 0,4/s. čísla symbolizují počet „žvýknutí“ [19]. Všechny gely používající se v rámci téhle studie byly nevratně zdeformovány během 2 – 8 s v závislosti na odpovídající deformaci.

U elektroforézy DNA může být velikost pórů 1% agarózového gelu od 100 nm do 500 nm a jejich pevnost umožňuje zředit agarózový gel až na 0,15%, což je jakási poslední hranice, kdy můžeme agarózový gel použít pro elektroforézu [20, 21]. Kdybychom měli srovnat agarózový gel s polyakrylamidovým gelem, musíme říct, že agarózový gel má menší rozpoznávací schopnost na DNA, ale má vyšší rozsah oddělení, který hraje klíčovou roli v samotném použití. Obecně mají agarózové gely při nízkých koncentracích větší velikost pórů a tvoří pevnější, méně pružné gely. Limit rozlišení pro standardní agarózové gely je přibližně 750 kb, ale rozlišení více než 6 Mb je možné např. v pulzní gelové elektroforéze (PFGE) [22]. Již 0,9% agarózový gel má póry dostatečně velké pro vstup bakteriofágu T4 [23]. Agaróza obsahuje záporně nabitě skupiny zejména na pyruvát a síran, které vytvoří proud vody, který se pohybuje opačným směrem vůči DNA [24]. Tím dochází ke zpomalení pohybu DNA a následnému tzv. rozmazání kapek. Pro vyšší koncentrace gelu bude hodnota elektroendoosmotického toku vyšší. Nízká hodnota elektroendoosmózy (EEO) agarózy je tedy obecně výhodná pro použití v agarózovém gelu nukleových kyselin, zatímco vysoká hodnota EEO agarózy může být použita pro jiné účely. Nižší obsah síranů nízké EEO agarózy je zejména pro nízkou teplotu tání (LMP) agarózy výhodný v případech, kdy DNA extrahujeme přímo z gelu. Nulové EEO agarózy však jsou nežádoucí pro některé aplikace, protože mohou být provedeny přidáním kladně nabitě skupiny a tyto skupiny mohou mít vliv na následné reakce enzymu [22].

### **2.3 Historie zkoumání difúze**

Prvním, kdo se k tomuto tématu vyjádřil, byl na počátku 19. století Thomas Graham. Byl to skotský chemik, původem z Glasgow, který vešel do povědomí především zkoumáním difúze plynů [25]. Jeho výzkum probíhal od roku 1828-1833 a své výsledky prezentoval v roce 1831. Magazín je uvedl až v roce 1833 [26]. Svými pokusy zjistil, že v případě styku plynů, různého charakteru, nedojde k uspořádání dle hustoty (nejtěžší nejníž a lehčí vzhůru), ale k náhodnému rozptýlení v podobě spontánní difúze [27].

V roce 1855 navázal na Thomase Grahama jeden z nejznámějších představitelů tematiky difúze Adolf Fick. Byl to německý fyziolog s výbornými matematickými znalostmi, který velmi sofistikovaně popsal difúzní jev. Přichází s myšlenkou, že mezi vedením tepla či elektrického proudu a samotnou difúzí je jakási podobnost, která by se dala matematicky vyjádřit. Svou práci proto stavěl na podobnosti Fourierova zákona o vedení tepla a Ohmova zákona o elektrickém proudu [28].

V druhé polovině 19. století přichází na scénu britský metalurg a spolupracovník Thomase Grahama William Chandler Roberts-Austen. Tento muž se zabýval fyzikálními vlastnostmi kovů a jejich slitin, konkrétně se podílel na studiu difúze pevných látek (difúze zlata v olovu) [29].



V roce 1858 přichází další velmi významný odborník oblasti fyzikální chemie Rudolf Clausius. Byl to německý fyzik a matematik, který na základě Jouleových a Carnotových prací formuloval pojem entropie. Je proto známý jako jeden ze zakladatelů termodynamiky a konceptu náhodné procházky vycházející z prací Roberta Browna [30]. V ten samý rok skotský fyzik James Clerk Maxwell odvodil první atomistickou teorii transportních procesů v plynech. Zároveň také jako první matematicky popsal elektromagnetické pole, známé jako Maxwellovy rovnice [31].

Za současné znění moderní atomistické teorie difúze vděčíme především těmto třem vědcům: Albert Einstein, Marian Smoluchowski a Jean-Baptiste Perrin. Albert Einstein, považovaný za největšího vědce 20. století, byl geniální teoretický fyzik, původem z Německa, který v oblasti difúze přispěl především popsáním Brownova pohybu. Tímto dokázal skutečnost atomů [32]. Dalším, kdo se zabýval teorií Brownova pohybu, byl polský vědec Marian Smoluchowski, který se ještě navíc věnoval difúzním jevům ve specifických podmínkách. Atomická struktura hmoty byla definitivně potvrzena až francouzským fyzikem Jean-Baptistem Perrinem, který ověřil teoretický základ Brownova pohybu [33].

V dnešní době se veškerá vědecká síla soustředí na výzkum difúzních rovnic, které formulují složité nelineární jevy.

## 2.4 Difúze

Difúze je vlastně přestup látky na základě tepelného pohybu částic, z prostředí o vyšším chemickém potenciálu do prostředí o nižším chemickém potenciálu. Jelikož chemický potenciál velice úzce souvisí s entropií a vlastně koncentrací, můžeme říct, že difúze je vlastně přestup látky z prostředí o vyšší koncentraci do prostředí o koncentraci nižší, tedy se jedná o přestup látky na základě jakéhosi koncentračního spádu. Rychlost jakou difúze probíhá záleží na velikosti částic, teplotě i vlastnostech prostředí. Během difúze se nespotebovává energie a výsledkem by mělo být (za předpokladu že do hry nevstupují jiné faktory) rovnoměrné rozptýlení rozpuštěné látky v rozpouštědle. Neuspořádaný pohyb molekul je důsledkem Brownova pohybu. Molekuly se nikdy nepohybují po preferované dráze, avšak pohyb je opravdu ve směru koncentračního gradientu. V situaci, kdy budeme chtít uskutečnit přestup látky ve fázi bez pohybu, tak pro pohyb molekul bude klíčový rozdíl koncentrací určité látky mezi dvěma místy [34]. Pokud budou v systému, kde je chemický potenciál funkcí prostorové souřadnice  $x$  navozeny podmínky konstantní teploty, konstantního tlaku a maximální práce  $dw$ , tak dostáváme rovnici [35]:

$$dw = \left( \frac{\partial u}{\partial x} \right)_{p,T} dx. \quad (1)$$

Pokud porovnáme rovnici (1) s obecným teoretickým vyjádřením práce dostáváme vztah:

$$dw = -Fdx, \quad (2)$$



kde  $F$  je síla působící ve směru opačném a získáváme výsledný vztah

$$F = - \left( \frac{\partial u}{\partial x} \right)_{p,T}. \quad (3)$$

Tato síla popisuje samovolnou schopnost částic rozptýlit se do prostoru [38]. Druhý termodynamický zákon vykládá působení této síly jako zvýšení celkové entropie, což vlastně znamená, že se systém dostane do stavu nejnižší vnitřní energie [1]

Nemusí se vždy jednat o difúzi jednostrannou. Běžně se setkáváme i s binární difúze. Jedná se o typ difúze, kdy obě látky do sebe navzájem difundují. Dobrým příkladem je system pevné látky a rozpouštědla, kdy difunduje pevná látka do rozpouštědla a současně difundují i molekuly rozpouštědla mezi molekuly pevné látky [36].

Dalším příkladem difúze může být tzv. samodifúze. Jedná se o difúzi, probíhající v rovnovážných směsích, kdy je hodnota koncentračního gradientu rovna nule. Rychlost takové difúze bude ovlivňovat hlavně teplota, tlak, velikosti částic, nebo viskozita okolí, zatímco u nerovnovážných systémů je difúze záležitost především koncentračního gradientu, který zde nenabývá nulových hodnot.

Obecně můžeme říct, že difúze závisí na rozměrech difundujících částic, teplotě a na vlastnostech prostředí. Nejrychleji probíhá v plynech, pomaleji v kapalinách (částice se pouze posouvají) a nejpomaleji v pevných látkách, kde částice pouze přeskakují na prázdná místa krystalové mřížky [37]

### 2.4.1 Fickovy zákony

Obecně můžeme říct, že se jedná o analogii mezi dvěma jevy, které spolu v jistém slova smyslu souvisí. Jelikož je difúze založena na „neuspořádanosti“, jakou se molekuly pohybují a na stejném principu je také založeno vedení tepla, můžeme matematicky popsat tyhle difúzní děje. Jako první přišel s nápadem matematicky popsat a odůvodnit tenhle proces Adolf Fick, který definoval hned dva zákony. První fickův zákon říká, že koncentrační gradient se s časem nemění. Druhý Fickův zákon již popisuje změnu koncentračního gradientu v čase. Na základě těchto poznatků se dostáváme k „difúznímu koeficientu“ [38].

#### *První Fickův zákon*

Definice jednorozměrného difúzního toku  $J_1$  v podání Adolfa Ficka [39]:

$$J_1 = A j_1 = -AD \frac{\partial c_1}{\partial x}, \quad (4)$$

kde  $A$  je symbol pro plochu, přes kterou probíhá difúze,  $j_1$  je tok přes jednotkovou plochu,  $c_1$  je koncentrace a  $x$  je vzdálenost. Koeficient  $D$  udává ochotu molekul cestovat v dané látce a svou hodnotou odpovídá difúznímu toku. Označuje se difúzní koeficient nebo difuzivita a má rozměr  $[m^2 \cdot s^{-1}]$ . Jeho hodnota je ovlivněna především teplotou, tlakem a především velikostí částic, které difundují [40,41].

Typickou vlastností binární difúze je podmínka, která nám říká, že hodnoty koncentračních gradientů budou nabývat stejných hodnot. Tyto gradienty jsou původem dvou stejně velkých, protichůdných difúzních toků. To je důvod, proč lze použít zjednodušenou rovnici pro první Fickův zákon [38], jejíž nejčastější znění se uvádí ve formě:

$$j_1 = -D \cdot \text{grad } c_1 = -D \nabla c_1, \quad (5)$$

kde  $j$  je difúzní tok, který odpovídá množství látky přenesené přes jednotkový objem za jednotku času. Nabývá tedy rozměru  $[\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}]$ . Znaménko minus, které najdeme na pravé straně rovnice symbolizuje průběh difúze z prostředí o vyšší koncentraci do prostředí o koncentraci nižší. Nesmíme ovšem opomenout vliv konvekce na difúzní tok. Tento vliv je sice zanedbatelný v roztocích o nízké koncentraci, kde se jedná o záležitost pouze difúzního toku. Ovšem s rostoucí koncentrací roztoku roste i vliv konvekce na celkový tok látky, což se projeví v matematickém popisu transportních procesů, které jsou o poznání komplikovanější. Rovnici (4) lze tedy použít výhradně pro popis difúze v roztocích o nízké koncentraci. V případě, že se jedná o průběh difúze ve směru jedné osy, nabývá rovnice jednoduššího tvaru [42]

$$j_1 = -D \cdot \frac{\partial c_1}{\partial x}. \quad (6)$$

Zde je hnací silou difúze látky, její koncentrační gradient pouze ve směru osy  $x$ . Ovšem to jak bude daná difúze probíhat není záležitost jen koncentrace popřípadě chemického potenciálu, ale velkou roli sehrává samozřejmě i teplota, viskozita, dielektrická konstanta roztoku, poloměr a valence rozpuštěné látky [43, 44]. Podrobné hodnocení každého z těchto faktorů můžeme nalézt v literatuře [44, 45].

### ***Druhý Fickův zákon***

Druhý Fickův zákon popisuje změnu koncentračního profilu s časem. Během difúze se však snižuje koncentrační gradient, což znamená, že koncentrace nezávisí jen na prostorové souřadnici, ale též na čase. Obecně se při probíhající difúzi mění koncentrace v trojrozměrném prostoru s časem, a proto je třeba najít funkci  $c(x,y,z,t)$  [46]. To je důvod, proč musíme přidat k prvnímu Fickovu zákonu ještě podmínku hmotné bilance (látky sice mění svoje rozložení v prostoru a v čase, její množství se však zachovává). Tak dostaneme druhou diferenciální rovnici, která je známa jako druhý Fickův zákon. Popisujeme-li difúzi v jednom prostorovém rozměru (lineární difúze), má druhý Fickův zákon tvar:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D_0 \frac{\partial^2 C}{\partial x^2}. \quad (7)$$

Nejčastěji používaná rovnice druhého Fickova zákonu, která je spojena s radioaktivním rozkladem chemických látek je však popsán následujícím způsobem:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D_0 \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} - \lambda C, \quad (8)$$

kde  $\lambda$  - je útlumová konstanta pro konkrétní radionuklid, který souvisí s poločasem rozpadu radionuklidu a to prostřednictvím vztahu [47]:

$$\lambda = 0,693 / t_{0,5}. \quad (9)$$

## 2.4.2 Fickovy zákony v porézním prostředí

Zde rozlišujeme různé druhy pórovitosti: celková, uzavřená, kinematická a retenční, která zahrnuje efektivní pórovitost. Nejdůležitější je celková pórovitost  $\varphi$  a efektivní, která se značí  $\varphi_{eff}$ . Pokud vezmeme v úvahu první Fickův zákon pro difúzní hmotnostní tok porézním médiem, měli bychom pracovat s efektivní pórovitostí  $\varphi_{eff}$ . Třetí a zároveň poslední definice pórovitosti se značí  $\varphi_{dif}$  a vyjadřuje objem kapaliny, ve kterém dochází k difúzi v rámci celkového objemu [48]. V případě, když celková pórovitost zahrnuje okluzní póry (dead - end póry), které brání difúzi, může dojít při difúzi porézním prostředím k tomu, že  $\varphi_{dif} > \varphi_{eff}$ , ale stále nižší než celková pórovitost  $\varphi$ .

Probíhá-li jednosměrný difúzní tok v porézním prostředí, potom si plochu  $A$ , na níž je tento difúzní tok vztažen, můžeme představit jako plochu tvořenou jednak tuhou fází a jednak kapalnou fází. S určitým zjednodušením lze předpokládat, že v kapalně fázi probíhá difúze stejným způsobem, jako v čistém roztoku, zatímco v tuhé fázi neprobíhá difúze vůbec. Porosita  $\varepsilon$  tedy ukazuje jaký velký podíl této plochy  $A$  je v daném prostředí přístupný difúzi. Hodnoty porosity se zpravidla pohybují v rozmezí od 0,1 do 0,6. Zahrnutí porézního média ovlivňuje první a druhý Fickův zákon pro šíření chemických látek ve vodném roztoku ve dvou hlavních směrech [43]:

1: Musíme předpokládat, že v porézním prostředí bude dráha difundující částice v důsledku přítomnosti částic zeminy zakřivená. Difúzivita dané částice bude tedy ve srovnání s čistým roztokem menší. Tortuozita  $t$  potom vyjadřuje korekci na zakřivenost dráhy. Toto zvýšení tortuozity zvyšuje makroskopický koncentrační gradient (zvyšuje rozdíly v koncentraci), a proto se snižuje difúzní hmotnostní tok. Jednoduše tedy můžeme říct, že difúzní hmotnostní tok je nepřímo úměrný přítomnosti porézní pevné látky v roztoku [49].

2: Mluvíme o interakci mezi rozptýlenými chemickými látkami a pevným porézním médiem, tedy o jakési sorpci. Též se můžeme setkat s fyzikálně chemickými reakcemi, které mají vliv na tortuozitu (například chování semipermeabilní membrány) [50].

### *První Fickův zákon pro šíření v porézním prostředí*

Dříve popsané rozdíly mezi difúzí ve volné formě nebo ve vodném roztoku (tj. v nepřítomnosti porézního média) proti difúzi v porézním médiu mohou být vzaty v úvahu úpravou rovnice [43]:

$$J_d = \theta \tau_m D_0 \frac{\partial C}{\partial X}, \quad (10)$$

kde  $\theta$  je objemová vlhkost (voda), respektive objem vody na celkový objem porézního média a  $\tau_m$  je geometrický, nebo maticový faktor tortuozity definovaný jako  $T_m = \cap^2$ , kde  $\cap$  je tortuozita definovaná  $\cap = \frac{L}{L_e}$ , kde  $L$  je lineární makroskopická vzdálenost mezi dvěma body porézního roztoku a  $L_e$  je skutečná mikroskopická vzdálenost mezi dvěma stejnými body.  $T_m$  může být ovšem definována jako:

$$T_m = \left( \frac{1}{\cap^2} \right) = \left( \frac{L_e}{L} \right)^2. \quad (11)$$

V tomto případě je Fickův první zákon pro jednosměrné difúze porézním materiálem popsán tímto způsobem:

$$J_d = - \frac{\theta D_0 \partial C}{T_m \partial_x}, \quad (12)$$

což má za následek stejnou hodnotu difúzního hmotnostního toku jako v rovnici

$$J_d = - \theta \tau_m D_0 \frac{\partial C}{\partial X}. \quad (13)$$

Obecně platí, že objemový obsah vody se vztahuje k míře nasycení vody následujícím způsobem,

$$\theta = \varphi \cdot S, \quad (14)$$

kde  $\varphi$  je poréznost porézního média. Podzemní voda je definována jako objem pórů na jednotku celkového objemu porézního média. Proměnná  $S$  je definována jako objem vody na jednotku póru, kdy musí platit podmínka, že  $0 \leq S \leq 1$ .

Rovnice

$$J_d = - \frac{\theta D_0 \partial C}{T_m \partial_x} \quad (15)$$

a

$$J_d = - \theta \tau_m D_0 \frac{\partial C}{\partial X} \quad (16)$$

můžeme sloučit do jedné jako:

$$J_d = - \varphi S \tau_m D_0 \frac{\partial C}{\partial X} = \frac{\varphi S D_0 \partial C}{T_m \partial_x}. \quad (17)$$

V případě nasycení porézního média (tj.  $S = 100 \% = 1$  můžeme rovnici zjednodušit tím, že se zbavíme právě zmíněné proměnné  $S$  a rovnice dostává novou formuli:

$$J_d = - \varphi \tau_m D_0 \frac{\partial C}{\partial X} = \frac{\varphi D_0 \partial C}{T_m \partial_x}. \quad (18)$$

Kromě tortuozity uvádí [43] další účinky, které ovlivňují rychlost difúze v porézních médiích jakožto: zvýšení viskozity vody v blízkosti pevných částic  $\mu$  a anion vyloučení  $\gamma$ . Jsou-li tyto dodatečné účinky považovány za relevantní, můžeme rovnici:

$$J_d = -\varphi\tau_m D_0 \frac{\partial C}{\partial X} = \frac{\varphi D_0 \partial C}{T_m \partial x} \quad (19)$$

napsat jako

$$J_d = -\varphi\mu\gamma\tau_m D_0 \frac{\partial C}{\partial X} = -\frac{\varphi\mu\gamma D_0 \partial C}{T_m \partial x}. \quad (20)$$

Jak viskozita, tak anion vyloučení musí být  $\mu, \gamma < 1$  [51].

### ***Druhý Fickův zákon pro šíření v porézním prostředí***

Fickův druhý zákon upravující přechodné šíření chemické látky v porézních médiích lze napsat jako

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \frac{D^* \partial^2 C}{R_d \partial x^2} = \frac{D_e \partial^2 C}{\alpha \partial x^2} = Da \frac{\partial^2 c}{\partial x^2}, \quad (21)$$

kde  $R_d$  je bezrozměrný retardační faktor,  $\alpha$  je bezrozměrný faktor kapacity a  $Da$  je zdánlivý difúzní koeficient. Retardační faktor, který je použitý v předešlé rovnici je velice úzce spojený s lineární, reverzibilní i okamžitou sorpcí chemických látek [51,52].

Retardační faktor vyjadřuje poměr celkové hmotnosti chemických látek na jednotku celkového objemu porézního média, vztaženého k vodné fázi chemických látek. Můžeme ho vyjádřit pomocí rovnice:

$$R_d = \frac{\varepsilon C + \rho_d C_s}{\varepsilon C} = 1 + \frac{\rho_d C_s}{\varepsilon C} = 1 + \frac{\rho_d}{\varepsilon} K_d, \quad (22)$$

kde  $C_s$  je koncentrace pevné fáze, vyjádřené jako sorbovaná hmota z chemických látek na jednotku hmotnosti pevné fáze, nebo hmotnosti pevných látek na jednotku celkového objemu pevných látek.  $K_d$  je distribuční koeficient, který vyjadřuje závislost koncentrace pevné fáze na koncentraci fáze kapalně (lineární, vratná okamžitá sorpce) [42]. V důsledku toho můžeme napsat, že sorbující látky mají distribuční koeficient  $K_d > 0$  a  $R_d > 1$ , zatímco nesorbující chemické látky  $K_d = 0$  tzn.  $C_s = 0$  a  $R_d = 1$  [42].

Když se zaměříme na popsání efektivních vlastností gelu a obohatíme difúzní koeficient o vliv porozity a tortuozity, dostáváme efektivní difúzní koeficient  $D_{eff}$ . Stokes-Einsteinova rovnice pro zředěné roztoky je definována jako [53, 54, 55]:

$$D_0 = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_s}, \quad (23)$$

kde  $k_B$  je Boltzmanova konstanta,  $T$  je teplota,  $\eta$  je dynamická viskozita a  $R_s$  je Stokesův poloměr. Pokud je teplotní závislost viskozity známá, tak dokážeme odhadnout difúzní

koeficient na základě Stokesova poloměru  $R_s$  a teploty  $T$ . Stokesův poloměr potom můžeme odhadnout z molekulárního poloměru  $R_0$ , v závislosti na [55]

$$R_0 = \sqrt[3]{\frac{3M}{4\pi\rho N_A}}, \quad (24)$$

kde  $M$  je molekulová hmotnost proteinu,  $\rho$  je hustota molekuly. Různé rovnice již byly využity k předpovědi difúzních koeficientů šířících se ve zředěných roztocích [56], nebo v gelu [57, 42], avšak braly v úvahu pouze vláknitou strukturu a fyzickou překážku, nikoliv vliv elektrického náboje na proteinu, nebo gelu. Chceme-li dojít k nejpřesnějšímu vyjádření difúzního koeficientu, musíme vycházet z rovnice zahrnující i vliv elektrického náboje [58]:

$$D_e \cdot \frac{C}{RT} \cdot \left( \frac{\partial \mu(z, t)}{\partial z} \right), \quad (25)$$

kde  $D_e$  je difúzní koeficient, který nezávisí na elektrostatické síle,  $\mu$  je chemický potenciál sloučeniny, která je funkcí nejen koncentrace, ale i iontové síly a pH. Tím dochází k přesunu závislosti náboje z difúzního koeficientu na koncentraci (chemický potenciál). Zanedbáním tlaku, příspěvkem teploty a chemického potenciálu [59] dostáváme rovnici:  $\mu = \mu^0 + RT \ln a + \mu_{el}$ , kde  $a$  je aktivita a  $\mu_{el}$  je příspěvek elektrostatického náboje na chemický potenciál.

### 2.4.3 Jednoduché modely difúze

Jelikož samotné řešení Fickových rovnic, kterým je věnováno všeobecně velké pozornosti v procesu difúze není příliš jednoduché, přichází Crank s myšlenkou vyřešit otázku týkající se difúzních experiment pomocí dvou typů difúze (difúze skrz tenký film a volná difúze) [60].

#### *Difúze skrz tenký film*

Tento typ difúze je specifický v tom, že se jedná o ustálenou difúzi, nezávislou na čase a probíhající jedním směrem mezi dvěma různě koncentrovanými a dobře míchanými roztoky. Průběh difúze skrz tenký film je dostatečně dlouhý a nedochází při něm k hromadění látky v bariéře. O ustálené difúzi mluvíme tehdy, když tok látky do filmu i z filmu nabývá stejných hodnot. Podoba druhého Fickova zákona je potom:

$$0 = D \frac{\partial^2 c_1}{\partial x^2}. \quad (26)$$

Jelikož difúzní koeficient  $D$  je konstantní [60], tak po zavedení okrajových podmínek  $c_1 = c_{10}$  pro  $x = 0$  a  $c_1 = c_{1l}$  pro  $x = l$  a následném zintegrování rovnice (26) dostáváme pozměněný tvar druhého Fickova zákona [36]:

$$\frac{c_1 - c_{10}}{c_{1l} - c_{10}} = \frac{x}{l}. \quad (27)$$

Z rovnice (26) vychází, že hodnota koncentračního profilu bude závislostí pouze okrajových podmínek, jako je koncentrace na okraji filmu, nebo tloušťka filmu  $l$ . Nebude záležet na hodnotě difúzního koeficientu  $D$ . Jelikož difúzní tok nezávisí na čase, tak suma látky, která

projde skrz tenký film bude s časem růst lineárně [36] [61]. Rovnice (27), charakterizující tok difúze přes difúzní bariéru lze upravit do tvaru

$$J_1 = -D_1 \cdot \frac{\partial c_1}{\partial x} \cdot (c_{10} - c_{1l}). \quad (28)$$

### ***Volná difúze***

Jinými slovy neustálená difúze. Jedná se o difúzní transport částic v jednom směru do prostoru, který lze vzhledem k své délce považovat za nekonečný (ve sledovaném čase nedosáhnou difundující částice druhého okraje difúzního média). Jako příklady těchto médií považujeme jak pevné, tak i kapalně a plynné látky. Difúzní médium v čase  $t = 0$  obsahuje konstantní koncentraci modelové látky. S rostoucí koncentrací na rozhraní se vytvoří lokální koncentrační gradient a látka začne difundovat hlouběji do média. Tato změna koncentrace na rozhraní tedy zapříčiní vznik časově proměnného koncentračního profilu dané látky. Celý problém spočívá ve stanovení změny koncentračního profilu difundující látky v závislosti na změně její koncentrace na rozhraní a čase [61]. Rovnici lze odvodit z diferenciální rovnice:

$$\frac{\partial c_1}{\partial t} = D \cdot \frac{\partial^2 c_1}{\partial x^2}. \quad (29)$$

Po dosazení příslušných okrajových podmínek. Po dalších úpravách Fickových zákonů lze získat následující rovnici [60]:

$$\frac{c_1 - c_{10}}{c_{1\infty} - c_{10}} = \operatorname{erf} \cdot \frac{x}{\sqrt{4Dt}}. \quad (30)$$

Z této rovnice je patrné, že difúzní tok volné difúze je funkcí jak polohy, tak i času. Upravením této rovnice získáváme nový tvar v podobě:

$$m_1 = \sqrt{\frac{4Dt_0}{\pi}} (c_{10} - c_{1\infty}). \quad (31)$$

Z rovnice vychází, že celkové množství látky přenesené přes rozhraní volnou difúzí je funkcí odmocniny z času. Čas, který dané místo potřebuje k dosažení určité koncentrace, je uměrný jeho vzdálenosti od rozhraní a převrácené hodnotě jeho difúzního koeficientu. Tím se liší volná difúze od difúze skrz tenký film, kdy při zdvojnásobení difúzního koeficientu  $D$  vzrostl tok na dvojnásobek (tenký film). V praxi se můžeme setkat s tímto kritériem:

$$\frac{(\text{vzdálenost})^2}{\left(\frac{\text{difúzní}}{\text{koeficient}}\right) \cdot (\text{čas})}. \quad (32)$$

Podle kritéria můžeme posoudit charakter difúze. V situaci, kdy bude parameter značně větší než 1, předpokládáme volnou (neustálenou) difúzi, v opačném případě difúzi skrz tenký film (ustálenou). Problém nastává v situaci, kdy parameter bude roven přibližně 1. V takovém případě bude potřeba hlubší analýzy [36].

#### 2.4.4 Metody pro stanovení difúzního koeficientu

Obecně se platně využívají dvě metody pro stanovení difúzního koeficientu  $D$ . Jedná se o difúzi z konstantního zdroje a difúze z okamžitého plošného zdroje [62].

##### *Metoda konstantního zdroje*

Tahle metoda vychází ze styku poměrně velkého množství difúzního média se zdrojem difundující látky, která má konstantní koncentraci  $c_0$ . Zdrojem difundující látky bývá pro praktické účely nasycený roztok obohacený o nerozpuštěné složky. To nám zajistí konstantní koncentraci během difúze.

Druhý Fickův zákon nabývá potom vztahu:

$$\frac{c_1}{c_{10}} = \operatorname{erfc} \frac{x}{\sqrt{4D_A t}} = 1 - \operatorname{erf} \frac{x}{\sqrt{4D_A t}}, \quad (33)$$

kde  $c_{10}$  představuje neměnnou koncentraci látky  $A$  v roztoku,  $\operatorname{erfc}$  je symbol doplňkové chybové funkce,  $\sqrt{4D_A t}$  vyjadřuje stupeň expanze látky  $A$  ve směru  $x$ . Obecně se nazývá délka difúze. Z rovnice (33) je patrné, že její hodnota roste s druhou odmocninou času. Celková suma látky, která projde rozhraním o jednotkové ploše za čas  $t$ , má potom tvar:

$$n_1 = 2c_{10} \sqrt{\frac{Dt}{\pi}}. \quad (34)$$

Z rovnice (34) můžeme stanovit difúzní koeficient látky.

Ovšem může nastat situace, kdy počáteční koncentrace nenabývá konstantních hodnot (tzn. ne  $c_0$ , ale  $c_{11}$ ), dostáváme rovnici [38]:

$$\frac{c_1 - c_{11}}{c_{10} - c_{11}} = \operatorname{erfc} \frac{x}{\sqrt{4Dt}}. \quad (35)$$

##### *Metody okamžitého plošného zdroje*

Tahle metoda se liší od předešlé množstvím nanesení difundující látky, které je podstatně menší. Obvykle se nanáší v podobě tenkého filmu na předem stanovený povrch difúzního média. Z praktického hlediska se vlastně jedná o filtrační papír, který je vložen do roztoku o známé koncentraci. Po zavedení okrajových podmínek  $t = 0$ ,  $x = 0$ ,  $c_1 = \frac{n_1}{\partial(x)A}$ , nebo  $t = 0$ ,

$-\infty < x < \infty$ ,  $c_1 = c_{10}$ , kde  $n_1$  symbolizuje sumu látkového množství látky, která difunduje na počátku experimentu ve zdroji. Koncentrační profil při jednosměrné difúzi nabude po uplynutí času  $t$  vztahu:



$$c_1 = \frac{n_1}{\sqrt{\pi Dt}} \exp\left(\frac{-x^2}{4Dt}\right). \quad (36)$$

V případě laboratorně stanovené koncentrace v čase  $t$ , stačí použít pro stanovení difúzního koeficientu zlogaritmování této rovnice ve tvaru:

$$\ln c_1 = \ln \frac{n_1}{\sqrt{\pi Dt}} - \frac{x^2}{4Dt}. \quad (37)$$

Pak už stačí jen prosté vynesení závislosti  $\ln c_1$  na  $x^2$  a získáváme směrnici přímky:

$$\operatorname{tg} \alpha = \frac{1}{4} Dt. \quad (38)$$

Podmínka nekonečného systému vychází z faktu, že délka vzorku musí být dostatečná na to, aby ta část difundující látky, která by se dostala za konečný rozměr systému, byla zanedbatelná vůči celkovému množství [38].

#### 2.4.5 Materiálová bilance difundující složky směsi

Velkou roli zde hraje hmotnostní bilance jednotlivých členů bilanční rovnice. Rychlost difuze je úměrná záporně vzatému gradientu koncentrace, tj. derivaci koncentrace podle vzdálenosti ve směru největšího poklesu koncentrace. Jako dobrý příklad by nám mohlo posloužit rozpuštění krystalu. Koncentrační gradient bude mít největší hodnotu v prvních okamžicích rozpuštění, kdy se krystal stýká s čistým rozpouštědlem. Postupně se vytváří stále rostoucí oblast roztoku a gradient koncentrace u fázového rozhraní klesá, což znamená, že se rozpouštění zpomaluje. Po velmi dlouhé (teoreticky nekonečné době) se krystaly přestanou rozpouštět a koncentrace roztoku bude všude stejná a rovná koncentraci na fázovém rozhraní. Dosáhne se rovnovážného složení roztoku. Intenzita transportu složky konvekci klesá ve směru k fázovému rozhraní. Na rozhraní fází nastává pouze molekulární difúze. Míchání urychlí transport v celé tekutině, tedy i na fázovém rozhraní na povrchu krystalů, kde nastává molekulární difúze. Musí se tedy zvětšit hodnota gradientu koncentrace na fázovém rozhraní ve srovnání s transportem v nehybné kapalině. Obecně můžeme říct, že se v oblasti fázového rozhraní poměrně hodně mění koncentrace. Základní rovnicí popisující transport složky ve směsi je bilance hmotností:

$$m_{ki} + \frac{dm_{kt}}{dt} = m_{ke} + \frac{dm_{ks}}{dt}. \quad (39)$$

První člen na levé straně rovnice značí přítok složky  $k$  vstupním průřezem, druhý rychlost přeměny této složky uvnitř systému chemickou reakcí, první člen na pravé straně vyjadřuje odtok složky  $k$  výstupním průřezem a poslední člen rychlost akumulace této složky uvnitř systému. Člen pro rychlost přeměny složky může existovat při ustáleném i neustáleném stavu. Rychlost akumulace vyjadřuje rychlost přírůstku či úbytku složky v systému vlivem neustálenosti děje (změna výšky hladiny kapaliny v nádobě) a může existovat jak při chemické reakci, tak i bez ní. Při ustáleném stavu je rychlost akumulace v systému nulová [62].

## 2.4.6 Difúzní cely

Samotné měření v difúzních celách nenachází největší uplatnění přes gelové vzorky, ale přes membrány, které se umístí mezi přijímací a zdrojovou celu. Přijímací cela je obvykle naplněna vodou a zdrojová cela nějakým organickým roztokem. Celková difúze nám vlastně říká, jak rychle proniká přes různě koncentrovaný v mém případě (agarózový gel) barvivo z přijímací cely do zdrojové. Jako membrána je hojně využíván skleněný papír, nebo kůže, která své největší uplatnění nachází v oblasti zkoumání pronikání léčiv skrz kůži do organismu. Experimenty zatím probíhají jen s vhodně upravenou lidskou, nebo zvířecí kůží. Na kůži se vloží látka, kterou chceme testovat a studuje se její difúze. Dostatečnou stabilitu celého systému zajistíme upevněním difúzních cel v „držácích“ [64]. Obrovské uplatnění dnes nachází difúzní experimenty v oblasti látek, které vykazují radioaktivní chování. Dobrým příkladem využití metody difúzních cel může být stanovení  $D_{eff}$  uranu v žule, jehož podoba v ní byla  $UO_2^{2+}$  [65]. Později byla zkoumána ještě difúze plutonia a americia [66]. Jedná se o difúzi ustálenou, pro kterou platí první Fickův zákon viz rovnice č. 4. Hodnota  $D_{eff}$  byla vypočítána podle vztahu:

$$\varepsilon D_{eff} = \left( \frac{dn}{dt} \right) \cdot \left( \frac{l}{\Delta C_{10}} \right), \quad (40)$$

kde  $\varepsilon$  je rozdělovací koeficient, který udává míru rozdělení organického barviva AG hydrogelu,  $D_{eff}$  je efektivní difúzní koeficient,  $\left( \frac{dn}{dt} \right)$  je změna látkového množství za čas a  $\left( \frac{l}{C_{10}} \right)$  symbolizuje podíl tloušťky gelu a změny koncentrace za čas. Poté už stačí pouze podělit rovnicí č. 40 rozdělovacím koeficientem  $\varepsilon$  a získáme  $D_{eff}$ . Hodnota  $D_a$  se potom spočítá podle vztahu:

$$D_a = \frac{l^2}{6 \cdot t_{průchodu}}, \quad (41)$$

kde  $D_a$  je hodnota zdánlivého difúzního koeficientu,  $l$  je tloušťka gelu a  $t_{průchodu}$  je doba průchodu první molekuly organického barviva.



*Obrázek č. 7: Stokesova difúzní cela [67]*

## 2.5 Organická barviva

Obecně jako barviva označujeme látky, které pohlcují určitou část světla se kterým přijdou do styku. Jelikož mluvíme o organických barvivech, tak se jedná o sloučeniny organického původu, které obsahují násobné vazby :  $C = C$ ,  $C = O$ ,  $C = N$ ,  $N = N$ . Rozlišujeme dva typy konjugace. Vzájemnou konjugaci a konjugaci s aromatickým kruhem. Molekula samotného barviva se skládá řekněme ze dvou základních částí. První z nich je chromofor, což je část molekuly, která obsahuje skupiny vyvolávající absorpci světla. Další částí je auxochrom, což je skupina, která absorpci světla mnohonásobně zvětšuje [68,69].

### 2.5.1 Rhodamin a methylenová modř

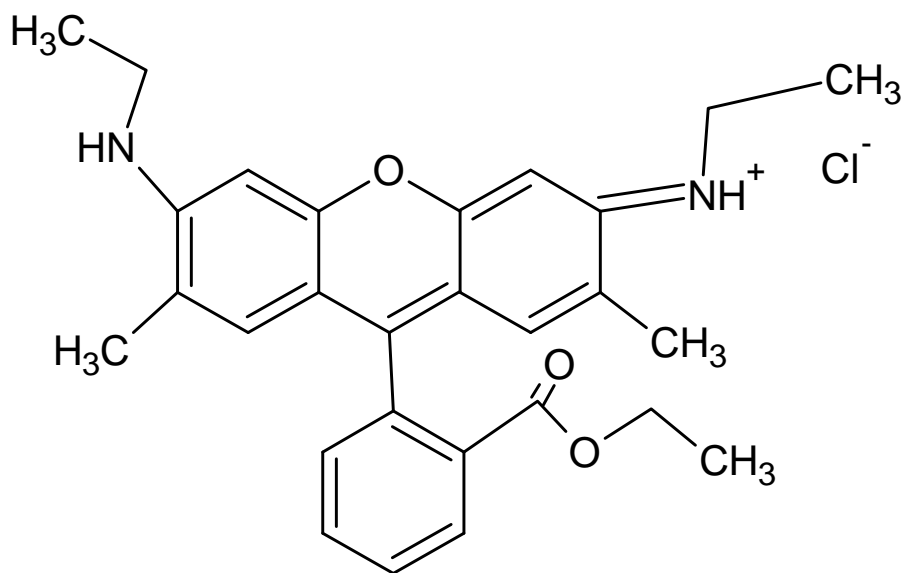
Zakomponování těchto organických barviv do mé bakalářské práce není náhodilé a má své opodstatnění. Jak rhodamin 6G, tak i methylenová modř jsou kationt aktivní organická barviva, která prochází skrz různě koncentrovaný agarózový gel ze zdrojové cely do přijmací cely. S rostoucí koncentrací agarózy klesá velikost pórů, kterými organické barvivo proniká a tudíž by difúze měla být rychlejší pro menší koncentrace agarózového gelu, tzn. pro větší póry. Zdrojová cela je naplněna právě jedním z těchto dvou barviv a přijmací cela je naplněna vodou. Nyní už je vše záležitostí difúze, která jak již bylo několikrát zmíněno probíhá z oblasti o vyšším chemickém potenciálu, který úzce souvisí s entropií a tudíž i s koncentrací do prostředí o nižším chemickém potenciálu. Jedná se tedy o přenos látky z prostředí o vyšší koncentraci do prostředí o koncentraci nižší. Sledujeme tedy jak rychle se kationt aktivní barvivo, ať už rhodamin 6G a nebo methylenová modř dostávají do části s vodou za účelem vyrovnání koncentrace v celém systému. Jelikož molární hmotnost rhodaminu je větší, než

molární hmotnost methylenové modři, předpokládáme, že rychleji bude difundovat methylenová modř, jejíž molekuly jsou menší a budou tedy procházet póry agarózy lépe.

### ***Rhodamin 6G***

Zaujímá významné postavení mezi organickými barvivy z důvodu výborných fotochemických a fotofyzikálních vlastností. Jedná se o kationt aktivní organické barvivo, s  $M_r = 479,02$  g/mol a sumárním vzorcem  $C_{28}H_{31}N_2O_3Cl$ . Je oranžově zbarvený, velmi dobře fluoreskuje a používá se jako indikační barvivo ve vodě k určení rychlosti a směru proudění (transportní procesy). Pro svou velmi dobrou schopnost fluoreskovat mohou být detekována velmi jednoduše a poměrně levně na přístroji zvaném fluorometr. Detekce na úrovni jedné molekuly je popsána v literatuře: [70, 71]. Využití tohoto barviva sahá až do oblasti biotechnologických aplikací, jako jsou např.: fluorescenční mikroskopie, fluorescenční korelační spektroskopie (označení fluorescence) [72]. Hojně se též využívá jako laserové barvivo [73, 74, 75].

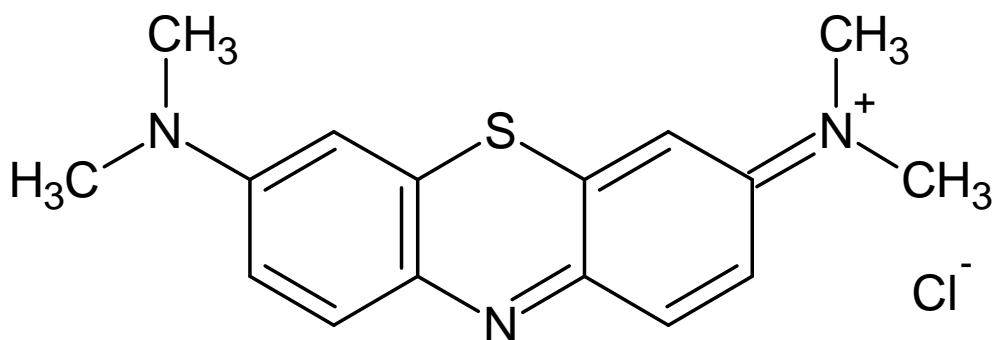
Obvykle se rhodamin 6G dodává ve třech různých formách. Rhodmain 6G chlorid je bronzově červený prášek s chemickým vzorcem  $C_{27}H_{29}N_2O_3Cl$ . Jeho velmi dobrou vlastností je rozpustnost, nicméně je pro svou vysokou tendenci korodovat a to téměř ve všech kovech kromě nerezové oceli ně tolik používaný. Další formy rhodaminu jsou sice méně rozpustné, ale i méně korozivní. Rhodamin 6G chloristan  $C_{27}H_{29}N_2O_7Cl$  je ve formě červených krystalů, zatímco rhodmain tetrafluoroborát  $C_{27}H_{29}BF_4N_2O_3$  je ve formě hnědých krystalů [76]. Rhodamin je obvykle toxický a dobře se rozpouští jak ve  $H_2O$ , tak i v  $CH_3OH$  a  $C_2H_5OH$  [77].



**Obrázek č. 8:** Rhodamin 6G

### Methylenová modř

Opět se jedná o kationtaktivní organické barvivo, s molární hmotností  $M_r = 319,85$  g/mol a sumárním vzorcem  $C_{16}H_{18}N_3SCl$ . Při pokojové teplotě se jedná o tmavě zelený prášek bez zápachu, který v přítomnosti s vodou tvoří modrý roztok. Hydratovaná forma má tři molekuly vody na molekulu methylenové modři (jde tedy o trihydrát). Obecně se uplatňuje v roztocích o nízké koncentraci [78]. Využívá se jako barvivo pro označení senzorů, pomocí kterých jsou poté studovány interakce v nukleové kyselině DNA [79].



Obrázek č. 9: Methylenová modř

## 3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Difúzí organických barviv skrz agarózový gel se zabývá poměrně široká skupina vědců. Cílem je stanovit hodnoty difúzních koeficientů a zjistit faktory ovlivňující jejich hodnotu. Nejčastěji se pro tyto účely používají organická barviva rhodamin 6G (RH) a methylenová modř (MM).

K. Samprovalaki a kol. zkoumali vliv různě koncentrovaných organických barviv, lišících se molekulovou hmotností, na hodnotu difúzního koeficientu ( $D_{eff}$ ). Difúze probíhala skrz 1,5% agarózový gel obohacený o 3% roztok  $CaCl_2$  metodou *in situ*. Experimenty probíhaly při třech různých teplotách 30 °C, 50 °C a 70 °C. Bylo zjištěno, že s rostoucí teplotou přípravy AG hydrogelu se  $D_{eff}$  u obou barviv zvyšuje. Co se týče koncentrace organických barviv, tak bylo použito pět různých koncentrací pro RH a jako nejlepší se jevila  $c = 1 \cdot 10^{-3}$  g/l, která vykazovala nejvyšší hodnoty difúzních koeficientů. Stejná koncentrace tedy byla aplikována i pro MM. Rychlost jakou difundovala MM byla větší, než u RH, protože molekuly MM jsou menších velikostí (nižší molekulová hmotnost), což se odrazilo i v hodnotě  $D_{eff}$ , která vyšla pro MM vyšší [80]. K. Samprovalaki a kol. vychází z myšlenky, že difúzní tok gelem v ustáleném stavu bude konstantní a měl by odpovídat koncentračnímu gradiendu. Konstatní tok bude udržen za předpokladu, že v místě vyššího koncentračního gradiendu bude menší  $D_a$ . To by mohlo být způsobeno změnou velikosti pórů v gelu, které potom ovlivní  $D_{eff}$  [39].

Další pokus výše citovaných autorů byl velmi podobný. Opět se jednalo o difúzi organických barviv RH a MM skrz různě koncentrovaný agarózový hydrogel, obohacený tentokrát o různě

koncentrovaný roztok  $\text{CaCl}_2$ . Navíc zde byl aplikován vliv elektrického pole a samotná vizualizace probíhala formou *in situ* po dobu 10 minut. Pokusy vycházely naprosto ze stejných podmínek teplot 30 °C, 50 °C a 70 °C, obohacených o čtyři různé napěťové gradiendy a jednou bez vlivu elektrického pole. Výsledky říkají, že difúze bude probíhat nejrychleji pro molekuly nejmenší velikosti a nejvyššího náboje, při nejvyšší teplotě. Obecně difundovalo opět dříve organické barvivo MM, které má menší molekulovou hmotnost a tudíž menší velikost molekul. Přídavek  $\text{CaCl}_2$  obecně způsobí stínící účinek neutralizující povrchové náboje na proteinu a tudíž zpomalí celkovou difúzi. Při změně koncentrace soli v gelu a v roztoku barviva se změní elektrická vodivost. Jakákoliv změna v rychlosti difúze může být spojena buď s vlivem solí na difúzní process, nebo s reakcí gelu v elektrickém poli a nebo s jejich vzájemnou kombinací. Nicméně po přidání 3% roztoku  $\text{CaCl}_2$ , vysoké teplotě a vysokém napětí došlo k difúzi RH rychleji, zatímco za stejně navozených podmínek pro MM nedošlo k žádné změně rychlosti difúze. Výsledkem bylo stanovení nejvyššího difúzního koeficientu, který vyšel pro RH nejvyšší a to při nejvyšší teplotě a nejvyšším napětí. Naopak při nejnižší teplotě byla difúze RH různě koncentrovaným AG hydrogelem stále stejná a pro MM byla větší při průchodu méně koncentrovaným AG hydrogelem [81].

Další cenný příspěvek co se týče hodnot  $D_a$  a  $D_{eff}$  přichází necelý rok poté. Klučáková a kol. zde zkoumali difúzi organického barviva MM metodou difúzních cel. Barvivo difundovalo skrz AG hydrogel o různé teplotě a koncentraci. Jak hodnoty  $D_a$ , tak i  $D_{eff}$  vycházely nejvyšší pro kombinaci nejvyšší teploty (50 °C) a nejnižšího obsahu AG v hydrogelu (1% hm.). Byl zde tedy potvrzen fakt že hodnota difúzních koeficientů je velmi ovlivněna jak teplotou, tak i koncentrací AG v hydrogelu. Ze srovnání těchto difúzních koeficientů se potom dá vypočítat efektivní porozita  $\varepsilon_{eff}$  a tortuozita  $T_m$ . S rostoucím obsahem AG v hydrogelu budou hustěji zesíťené sítě a bude klesat efektivní velikost pórů. Ta se zde vyhodnotila metodou Aymardova grafu v závislosti na obsahu AG v hydrogelu. Celková pórovitost gelů se potom odhaduje z hmotnostní koncentrace za předpokladu ideálního promíchání agarózy a vody. Hodnoty se blíží 1 a jsou podstatně větší, než  $\varepsilon_{eff}$ . Velmi překvapivé zde bylo zjištění vlivu  $T_m$ . Při průchodu molekuly rozpuštěné látky hydrogelem byla totiž vzdálenost, kterou molekula urazí přibližně dvakrát větší, než je tloušťka gelu. Experimentální výsledky také ukazují pokles  $T_m$  s teplotou, což znamená, že se difúzní dráha prodlouží při vyšších teplotách [82]. Zředěný agar a agarózové gely se používají i jako referenční prostředí o jednotkové tortuozitě pro zkoumání vlastností některých tkání [83]. Byla zde stanovena i hodnota rozdělovacího koeficientu  $\varepsilon$ , která se vypočítala přímo z hmotnosti rozpuštěné látky absorbované v gelu na konci experimentu. Ve skutečnosti je tento koeficient roven poměru střední koncentrace rozpuštěné látky v gelu a aritmetického průměru koncentrací rozpuštěných látek jak v přijmacích, tak i ve zdrojových částech difúzních cel na konci experimentu. Blíže informace je možno najít v literatuře [84].

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Použité chemikálie

- agaróza SIGMA-ALDRICH
- rhodamin 6G SIGMA-ALDRICH
- methylenová modř SIGMA-ALDRICH
- destilovaná voda

### 4.2 Použité přístroje

- Hitachi – 3900 H spektrofotometr
- UV-VIS spektrofotometr CARY 50 PROBE
- Váhy (Scaltex SPB61)

### 4.3 Metodika přípravy agarózového hydrogelu

*Tabulka č. 1: Příprava agarózového gelu*

AG hydrogel [% hm.]	Navážka agarózy [g]	Množství vody [ml]
0,5	0,05	10
1	0,1	10
2	0,2	10

Byly připraveny roztoky AG hydrogelu viz (tabulka č. 1). Ty byly poté zahřívány na teplotu 85 °C, kdy se jejich konzistence začínala měnit v gel. Pro první experiment byl tento gel slit do teflonového kroužku, na který bylo předem ze spodní části připevněné pomocí dvou držáků sklíčko. Gel byl naléván na sklíčko tak dlouho, dokud nedošlo k vytvoření tzv. “gelové čepičky”. Poté se přiložilo druhé sklíčko, opět se připevnilo držákem a gel se nechal tuhnout po dobu 45 minut.

### 4.4 Difúzní experimenty

Bylo připraveno 60 ml organického barviva o  $c = 0,01 \text{ g/l}$  (rhodamin, nebo methylenová modř). Dále bylo odměřeno 60 ml vody a oba tyto roztoky byly slity do kádinky. Poté byly připraveny difúzní cely, které byly natřeny na okrajích lepidlem, aby k sobě lépe přilnuly a čekalo se až gel dostatečně ztuhne. Jakmile gel ztuhl, byly sundány držáky, opěrné sklíčka a teflonový kroužek s gelem byl vložen mezi tyto dvě difúzní cely. Ty byly vloženy do držáku, který zajistil větší zpevnění cel u sebe. Dále byly umístěny difúzní cely na magnetickou míchačku, kde do každého vstupu difúzní cely bylo vloženo magnetické míchadlo. Do přijmací cely poté bylo nalito 60 ml vody z kádinky a do zdrojové cely 60 ml organického barviva. Do přijmací difúzní cely byla vložena sonda OCEAN OPTICS. Magnetická míchačka byla zapnuta a vstupy difúzních cel byly zalepeny parafilmem. Pomocí počítačového programu OCEAN OPTICS SPECTRASUITE nastaveno měření tak, aby byla

automaticky zazaménávána každou půl hodinu závislost absorbance na vlnové délce. Po 24 hodinách bylo měření ukončeno, difúzní cely byly vyjmuty z magnetické míchačky, sondy vypnuty a byl zkontrolován peak pro rhodamin (525 nm) a methylenová modř (665 nm). Pomocí kapátka bylo překapáno do kyvety jak z přijmací, tak ze zdrojové cely difundující barvivo s vodou a pomocí přístroje HITACHI U-3900H spektrofotometru byla změřena absorbance roztoku v obou kyvetách proti vodě. Počítač s programem HITACHI-UV SOLUTION 3900-H SPEKTROFOTOMETR vyhodnotil absorbanci v kyvetě pro přijmací i zdrojovou celu, kterou měřil v rozmezí od 900-300 nm. Nakonec bylo celé měření vyhodnoceno, pomocí programu excel a byl určen difúzní koeficient, doba průchodu barviva a koncentrace barviva v gelu.

#### 4.5 Charakterizace gelů

Pro druhý experiment byly opět připraveny roztoky agarózy o třech různých koncentracích, jako tomu bylo v prvním experimentu. Takto připravené roztoky byly opět zahřáty na teplotu 85°C a poté byly přelity rovnou do kyvet. Po 45 minutách byly čepičky kyvet skalpelovým nožem uříznuty a postupně byly vkládány od nejnižší po nejvyšší koncentraci do přístroje UV-VIS CARY 50 PROBE. Zde byly opět nastavené potřebné parametry pro samotné měření a byla měřena závislost absorbance na vlnové délce, kdy paprsek procházející kyvetou byl ve výšce 6 cm. Hodnoty absorbance byly potom přepočítány na turbiditu podle vztahu:

$$\tau = \frac{2,303 \cdot A}{l} . \quad (40)$$

V situaci, kdy  $l = 1 \text{ cm}$ , tak vlastně vztah pro turbiditu přechází do tvaru:

$$\tau = 2,303 \cdot A . \quad (41)$$

Poté byl vynesena graf závislosti  $\log(\tau)$  na  $\log(\lambda)$ . Z rovnice regrese byl získán vlnový exponent, který nám po vynesení v aymardově grafu, stanovil velikost porů agarózového gelu všech tří koncentrací.

#### 4.6 Difúzní cely

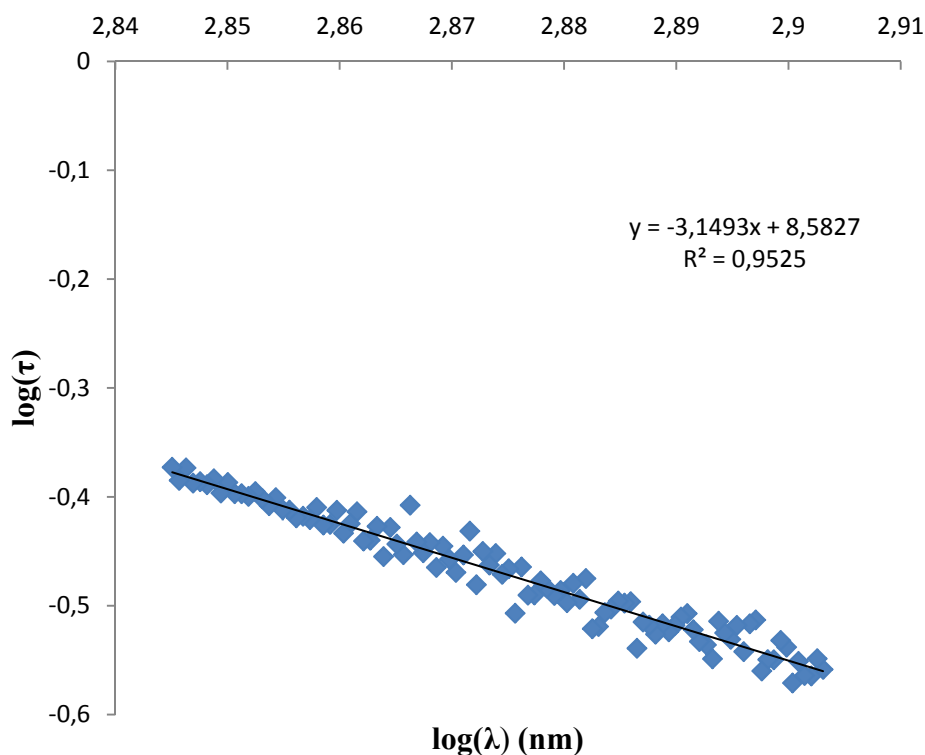
Jelikož měření v difúzních celách není primárně určeno pro měření difúze skrz gelové vzorky, ale přes membrány jako je kůže, folie, nebo skleněný papír, pracuje se se speciálně vytvořenou formou pro měření transportu skrz polotuhé vzorky. Pro tento účel používáme vysoustruženou teflonovou vložku s kruhovým otvorem o vnitřním průměru 4 cm a tloušťce 1 cm. Samotná difúzní cela je vlastně skleněná nádoba, která se skládá z přijmací a zdrojové části. Jejich odlišnost spočívá pouze v obsahu. Přijmací cela je naplněna vodou a zdrojová cela organickým barvivem. Mezi těmito celami je různě koncentrovaný agarózový gel, přes který probíhá difúze. Sledujeme změnu koncentrace v přijmací části difúzní cely, kterou můžeme stanovit různým způsobem. Samotné měření probíhá vzhledem k časové náročnosti, kterou si každý experiment žádá, plně automaticky. To je jedním z důvodů, proč se využívá k určování změny koncentrace difúzního média v přijmací komoře difúzní cely spektroskopických metod. Změna koncentrace vybraného difúzního média (organické



barvivo) skrz agarózový gel je určována tím, že se automaticky změní spektra v UV-VIS oblasti pomocí spektrometrické sondy, která je s počítačem propojena. Ve zvolených časových intervalech (30 minut) jsou automaticky zaznamenávána naměřená spektra a z nárůstu absorpance poté zjistíme změnu koncentrace difúzního média v přijímací části difúzní cely. Změnou koncentrace za čas jsou stanoveny základní parametry, které celou difúzi charakterizují. Jedná se o hodnotu efektivního difúzního koeficientu ( $D_{eff}$ ), hodnotu zdánlivého difúzního koeficientu ( $D_a$ ), hodnotu rozdělovacího koeficientu  $\varepsilon$ , čas průchodu difúzního média skrz porézní přepážku ( $t_{průchod}$ ) a koncentraci barviva v gelu ( $c_{barviva}$ ). Výhodou tohoto měření je v první řadě automatizace, která nám zajistí chod samotného procesu i několik dní bez naší fyzické přítomnosti. Další výhodou je přesnost měření, kdy můžeme dosáhnout při stanovení difúzních parametrů velmi malých odchylek měření. Nevýhodou může být velký objem vzorků a počet měření, který je nezbytný pro stanovení správných hodnot [67].

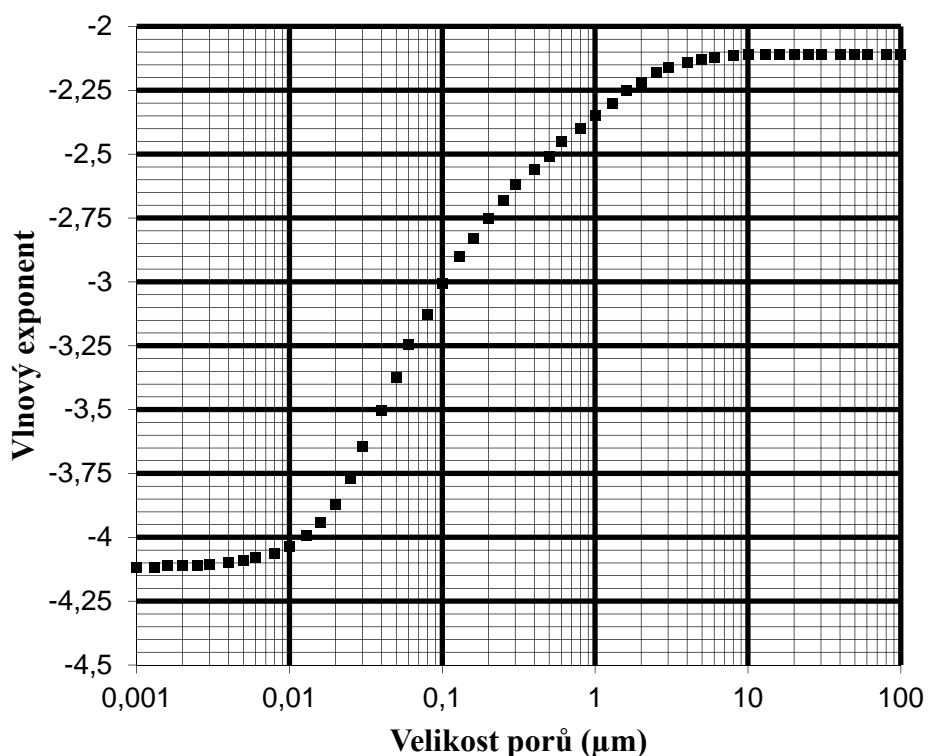
## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 Charakterizace hydrogelů



**Obrázek č. 10:** Závislost logaritmu transmittance na logaritmu vlnové délky pro 2% AG

Na (obrázku č. 10) je znázorněna závislost  $\log(\tau)$  na  $\log(\lambda)$ . Ze směrnice této závislosti získáme hodnotu vlnového exponentu, ze které pomocí Aymardova grafu (viz obrázek č. 11) stanovíme velikost pórů.



*Obrázek č. 11: Aymardův graf závislost vlnového exponentu na velikosti pórů pro 2% AG*

*Tabulka č. 2: Průměrná velikost pórů a hodnoty hustot pro různě koncentrovaný agarózový gel*

AG hydrogel [% hm.]	Póry [ $\mu\text{m}$ ]	Obj. hmotnost [ $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ]
0,5	0,30	0,792
1	0,18	0,865
2	0,08	0,887

S rostoucím obsahem agarózy v hydrogelu klesá velikost pórů a zároveň roste objemová hmotnost, protože vyšší koncentrace agarózy znamená hustší 3D síť v gelu. Objemová hmotnost totiž závisí nejen na hustotě vlastní látky v kompaktním stavu, ale i na hustotě látky vyplňující póry. S rostoucí koncentrací AG v hydrogelu bude klesat velikost pórů, tzn. sníží se hustota látky vyplňující póry a celková objemová hmotnost hydrogelu bude vyšší, než pro nižší koncentrace, větší póry a vyšší hustotu látek vyplňující póry.

## 5.2 Difúzní experimenty

*Tabulka č. 3: Výchozí parametry pro difúzní experimenty*

<b>Tloušťka gelu</b>	0,00557 m
<b>Poloměr otvoru</b>	0,01999 m
<b>Plocha</b>	0,00125 m <sup>2</sup>
<b>Objem roztoků</b>	0,00006 m <sup>3</sup>
<b>Molární hmotnost RH</b>	479,02 g.mol <sup>-1</sup>
<b>Molární hmotnost MM</b>	319,85 g.mol <sup>-1</sup>

**Tabulka č. 4:** Stanovení času průchodu difúze ( $t_{\text{průchod}}$ ), rozdělovacího koeficientu ( $\varepsilon$ ), efektivního difúzního koeficientu ( $D_{\text{eff}}$ ), zdánlivého difúzního koeficientu ( $D_a$ ), poměru efektivního a zdánlivého difúzního koeficientu  $\left(\frac{D_{\text{eff}}}{D_a}\right)$  a koncentrace barviva v gelu ( $c_{\text{barviva}}$ ) pro organické barvivo

*rhodamin (RH) různě koncentrovaným roztokem AG*

AG	$t_{\text{průchod}}$	$\varepsilon$	$D_{\text{eff}}$	$D_a$	$D_{\text{eff}}/D_a$	$c_{\text{barviva v gelu}}$
[% .hm]	[hod]		$[m^2 \cdot s^{-1}]$	$[m^2 \cdot s^{-1}]$	$[m^2 \cdot s^{-1}]$	$[mol \cdot m^{-3}]$
0,5	3,05	5,58	$2,14 \cdot 10^{-10} \pm 1,42 \cdot 10^{-11}$	$4,71 \cdot 10^{-10} \pm 3,13 \cdot 10^{-11}$	$0,45 \pm 0,03$	0,041
1	4,05	6,88	$1,55 \cdot 10^{-10} \pm 8,45 \cdot 10^{-12}$	$3,55 \cdot 10^{-10} \pm 3,01 \cdot 10^{-11}$	$0,44 \pm 0,03$	0,048
2	6,03	8,41	$6,44 \cdot 10^{-11} \pm 1,31 \cdot 10^{-12}$	$2,38 \cdot 10^{-10} \pm 1,08 \cdot 10^{-11}$	$0,27 \pm 0,01$	0,060

**Tabulka č. 5:** Stanovení času průchodu difúze ( $t_{\text{průchod}}$ ), rozdělovacího koeficientu ( $\varepsilon$ ), efektivního difúzního koeficientu ( $D_{\text{eff}}$ ), zdánlivého difúzního koeficientu ( $D_a$ ), poměru efektivního a zdánlivého difúzního koeficientu  $\left(\frac{D_{\text{eff}}}{D_a}\right)$  a koncentrace barviva v gelu ( $c_{\text{barviva}}$ ) pro organické barvivo methylenová

*modř (MM) různě koncentrovaným roztokem AG*

AG	$t_{\text{průchod}}$	$\varepsilon$	$D_{\text{eff}}$	$D_a$	$D_{\text{eff}}/D_a$	$c_{\text{barviva v gelu}}$
[% .hm]	[hod]		$[m^2 \cdot s^{-1}]$	$[m^2 \cdot s^{-1}]$	$[m^2 \cdot s^{-1}]$	$[mol \cdot m^{-3}]$
0,5	3,40	3,48	$1,81 \cdot 10^{-10} \pm 9,32 \cdot 10^{-12}$	$4,22 \cdot 10^{-10} \pm 5,19 \cdot 10^{-12}$	$0,43 \pm 0,01$	0,045
1	4,08	4,62	$1,35 \cdot 10^{-10} \pm 6,67 \cdot 10^{-12}$	$3,52 \cdot 10^{-10} \pm 2,51 \cdot 10^{-11}$	$0,38 \pm 0,02$	0,054
2	4,21	5,50	$1,25 \cdot 10^{-10} \pm 7,22 \cdot 10^{-12}$	$3,41 \cdot 10^{-10} \pm 2,35 \cdot 10^{-11}$	$0,37 \pm 0,02$	0,064

Z (tabulky č. 4) je patrné, že čas průchodu první molekuly organického barviva RH byl nejmenší (difúze proběhla nejrychleji) pro nejméně koncentrovaný 0,5% roztok AG v hydrogelu  $t_{průchod} = 3,05 \text{ hod}$ . S rostoucí koncentrací se poté čas průchodu zvyšoval a nejvyšší byl pro 2% roztok AG v hydrogelu. Důvodem je velikost pórů, která roste s klesající koncentrací AG v hydrogelu viz (obrázek č. 19). Nejméně koncentrovaný 0,5% roztok měl největší průměrnou velikost pórů a tudíž molekuly organického barviva difundovaly těmito póry nejsnadněji. Naopak difúze póry 2% AG hydrogelu byla pro molekuly organického barviva nejsložitější, a proto byl i čas průchodu nejvyšší viz (obrázek č. 12). Naopak nejkoncentrovanější AG hydrogel vykazoval nejvyšší hodnoty objemové hmotnosti, které jsou způsobeny zahuštěním 3D sítě gelu viz (obrázek č. 20).

Rozdělovací koeficient  $\varepsilon$  udávající míru rozdělení částic mezi vodným roztokem a gelem naopak vyšel pro nejméně koncentrovaný roztok AG hydrogelu nejmenší. Pro MM činila tato hodnota  $\varepsilon = 3,48$  a pro RH  $\varepsilon = 5,58$ . S rostoucí koncentrací se poté zvyšoval. Tento koeficient dosti koresponduje s koncentrací barviva, které zůstalo v gelu. V malých pórech se barvivo zachycovalo lépe, což je důvodem toho, že s rostoucí koncentrací AG v hydrogelu se  $\varepsilon$  zákonitě zvyšoval viz (obrázek č. 13)

Hodnota efektivního difúzního koeficientu  $D_{eff}$  charakterizuje difúzi ve stádiu, kdy už všechny částice prošly gelem, a proto by případné interakce již neměly mít na tento průchod žádný vliv. Hodnoty zdánlivého difúzního koeficientu  $D_a$ , kdy částice ještě gelem neprošly i  $D_{eff}$  velmi úzce souvisí s časem průchodu a samozřejmě s koncentrací roztoku AG v hydrogelu. Jelikož s rostoucí koncentrací AG v hydrogelu se snižuje průměrná velikost pórů, která má za následek obtížnější difundování molekul organického barviva, budou hodnoty jak  $D_{eff}$  viz (obrázek č. 14), tak i  $D_a$  viz (obrázek č. 16) s rostoucí koncentrací AG v hydrogelu klesat, zatímco doba průchodu bude samozřejmě větší. Čím je difúze rychlejší, tím je hodnota obou difúzních koeficientů vyšší.

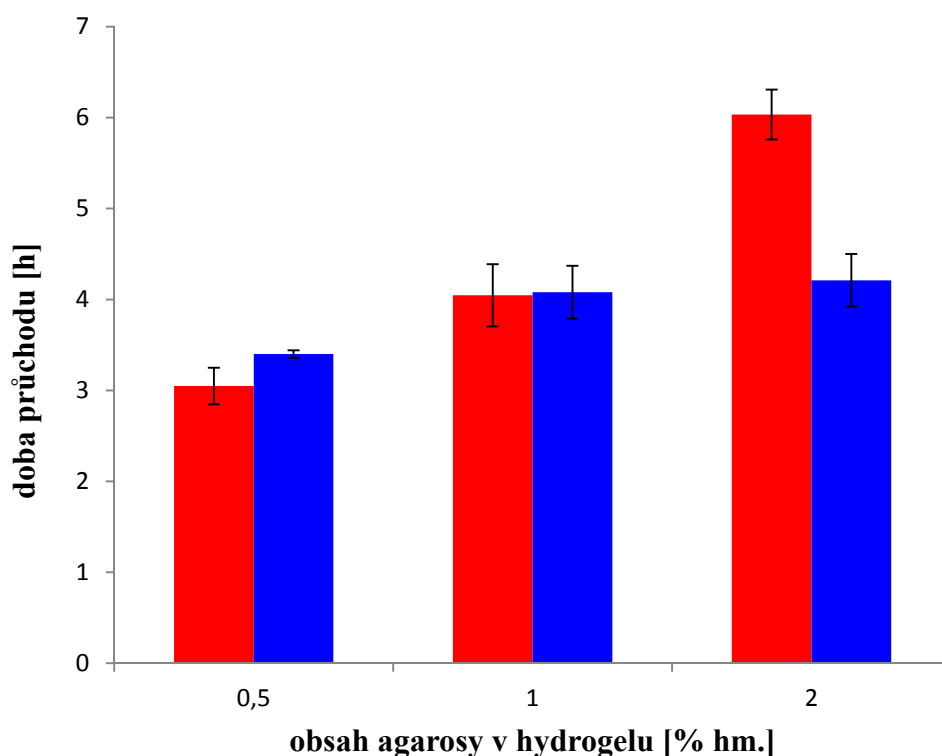
Naprostě stejný trend jeví i druhé organické barvivo MM, které najdeme v (tabulce č. 5). V situaci, kdy srovnáme obě organická barviva dostáváme zajímavé výsledky. Nejrychleji proběhla difúze pro organické barvivo RH skrz nejméně koncentrovaný 0,5% roztok AG hydrogelu viz (obrázek č. 12). Difúze RH zde byla o přibližně 20 minut rychlejší, než u MM. Odpovídá tomu i nejvyšší hodnota difúzních koeficientů  $D_{eff}$  viz (obrázek č. 14) a  $D_a$  viz (obrázek č. 16) pro RH. Naopak nejpomaleji difundovalo opět organické barvivo RH skrz nejkoncentrovanější 2% roztok AG hydrogelu viz (obrázek č. 12). Když zde srovnáme difúzi RH a MM zjistíme, že MM difundovala skrz 2% roztok AG hydrogelu podstatně dříve. Opět tomu odpovídají i hodnoty difúzních koeficientů  $D_{eff}$  a  $D_a$ , které nabývají pro RH nejmenších hodnot. Difúze obou organických barviv skrz 1% roztok AG vychází velmi podobně. Časově se průběh difúze 1% roztoku AG téměř neliší. Hodnota  $D_{eff}$  je vyšší pro RH a hodnota  $D_a$  se pro obě organické barviva 1% roztoku AG jeví velmi podobně. Výsledky jsou velmi zajímavé, jelikož MM by skrze svoji menší molekulovou hmotnost měla difundovat snadněji a tudíž rychleji než RH. V nejkoncentrovanějším roztoku AG hydrogelu se tato hypotéza potvrdila, nicméně v nejméně koncentrovaném difundovalo rychleji

organické barvivo RH. Důvodem může být struktura 0,5% AG hydrogelu, která již má tak velké póry, že by molekulová hmotnost organického barviva nemusela hrát tak zásadní roli, jako při koncentracích vyšších a tedy nižších velikostí pórů.

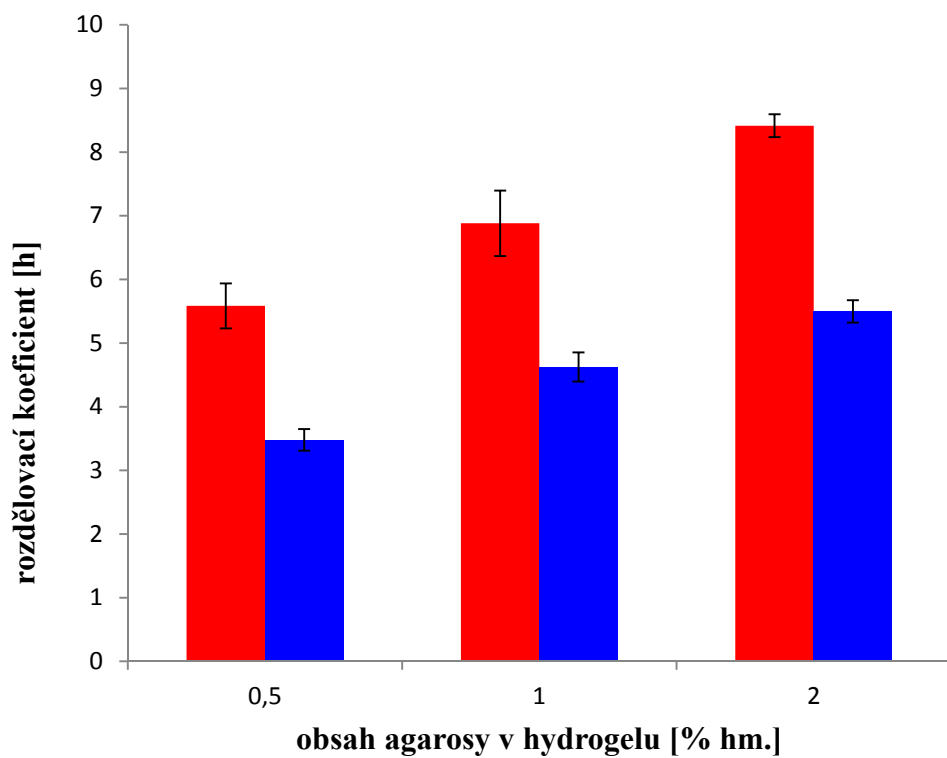
Hodnota rozdělovacího koeficientu byly nejvyšší pro organické barvivo RH viz (obrázek č. 15) difundující nejkoncentrovanějším 2% AG hydrogelem  $\varepsilon = 8,41$ . Jeho hodnota zde byla o hodně vyšší, než byla hodnota pro MM  $\varepsilon = 5,50$ . Obecně lze říct, že hodnoty rozdělovacích koeficientů pro RH různě koncentrovaným AG hydrogelem byly vyšší, než pro MM. Nejnížší hodnotu jsme zaznamenali pro nejméně koncentrovaný 0,5% AG hydrogel, kterým difundovalo organické barvivo MM

Nejvíce difundovalo organické barvivo do nejkoncentrovanějšího 2% roztoku AG hydrogelu. Koncentrace MM v 2% roztoku AG byla jen nepatrně větší, než u RH. Nejmenší hodnoty koncentrace barviva v gelu byly zaznamenány pro RH, kterého v 0,5% roztoku AG bylo méně než u MM viz (obrázek č. 18).

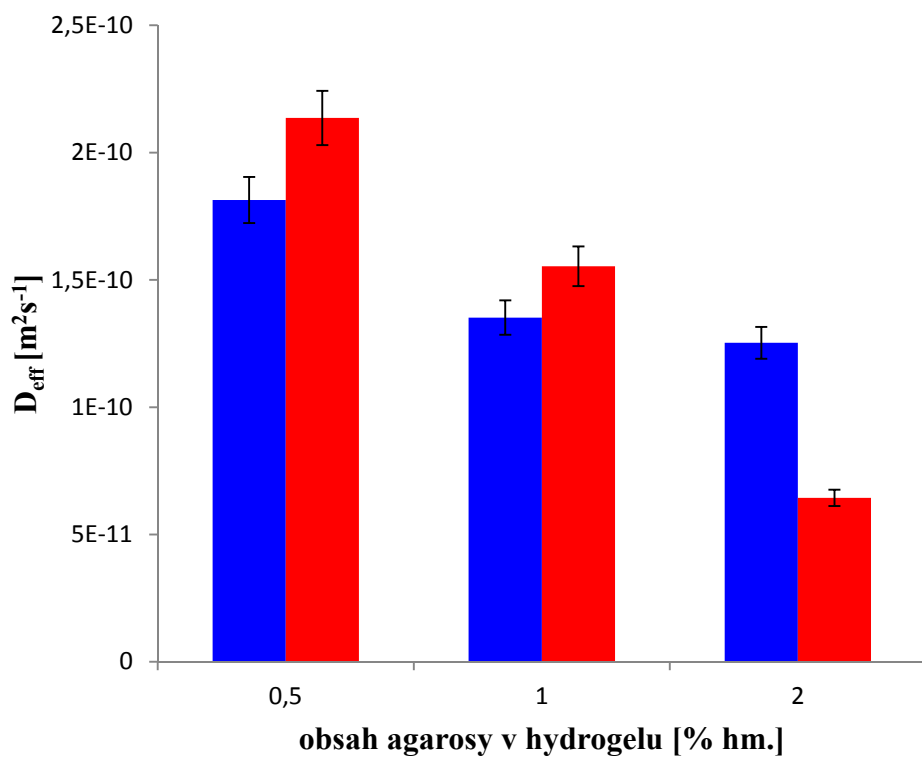
Grafy na (obrázcích č. 12-20) odkazují na parametry difúze pro organické barvivo rhodamin RH (červeně zbarvené) a methylenovou modř MM (modře zbarvenou).



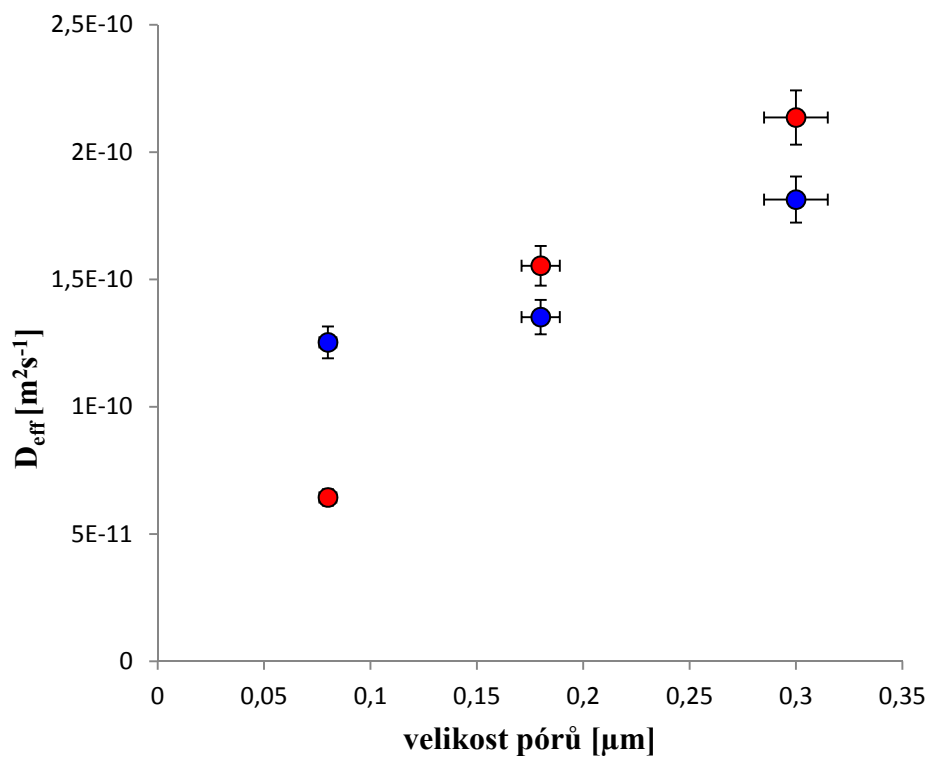
**Obrázek č. 12:** Závislost doby průchodu difúze na obsahu agarózy v hydrogelu



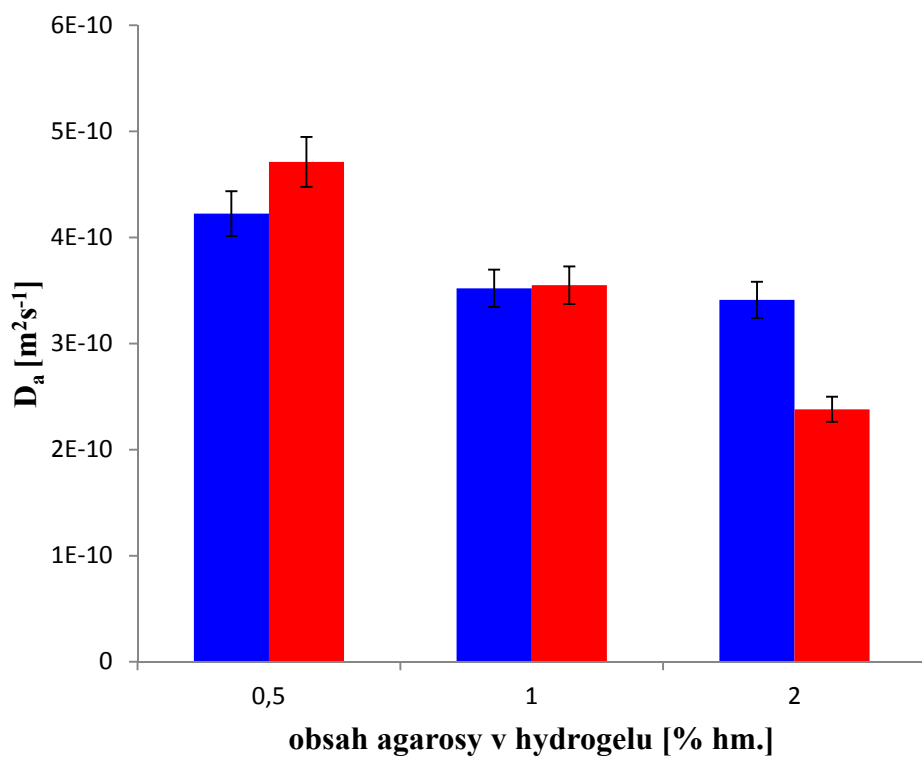
**Obrázek č. 13:** Závislost rozdělovacího koeficientu difúze na obsahu agarózy v hydrogelu



**Obrázek č. 14:** Závislost efektivního difúzního koeficientu difúze na obsahu agarózy v hydrogelu

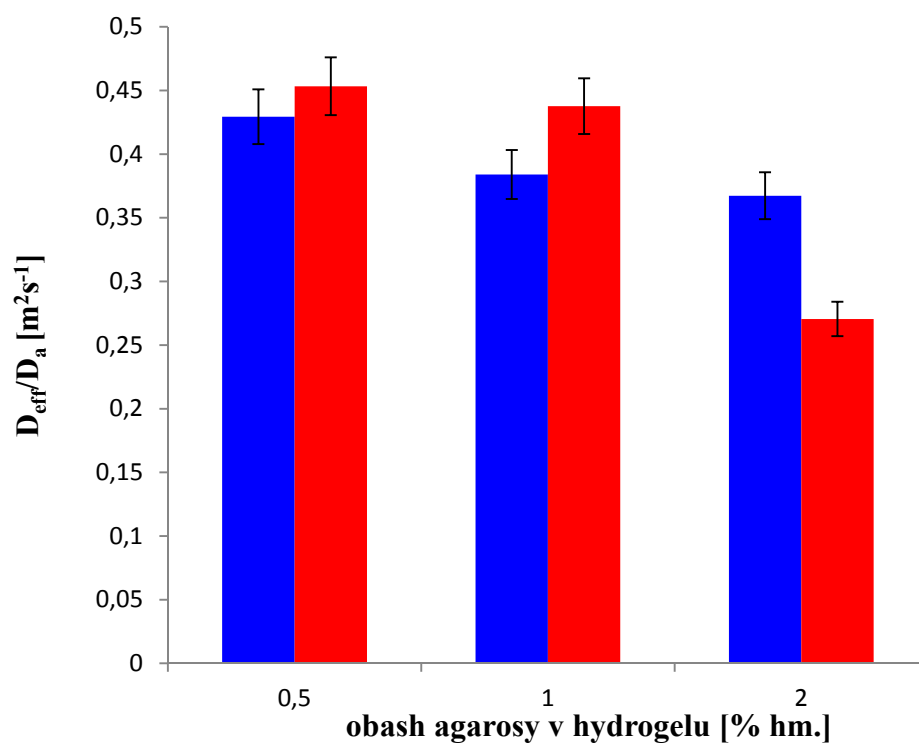


**Obrázek č. 15:** Závislost efektivního difúzního koeficientu na velikosti pórů

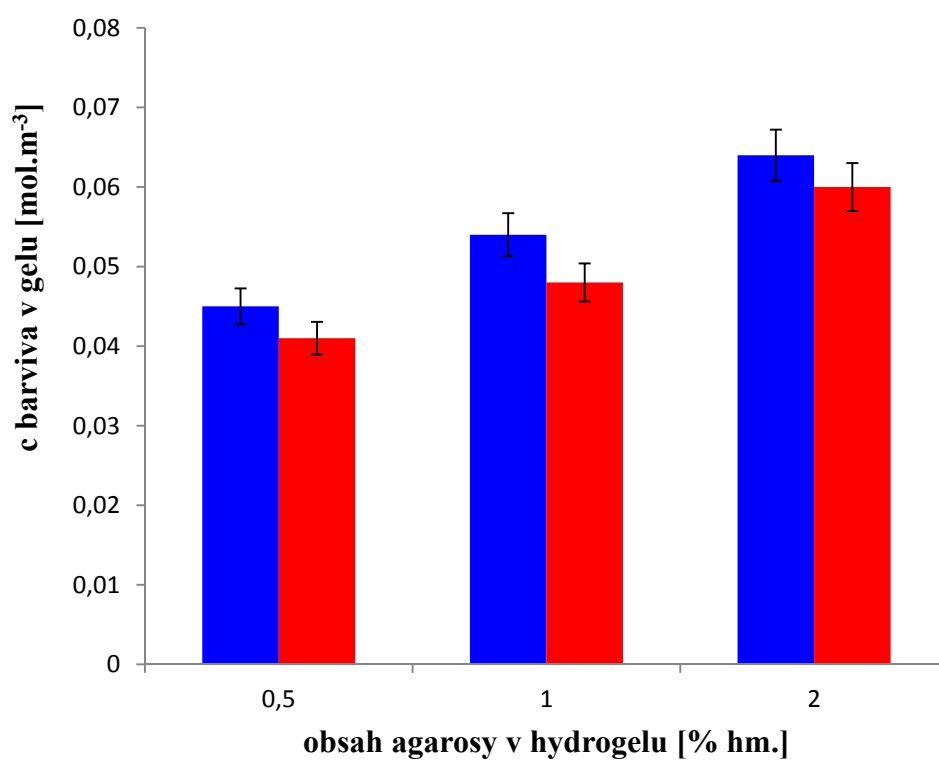


**Obrázek č. 16:** Závislost zdánlivého difúzního koeficientu na obsahu agarózy v hydrogelu

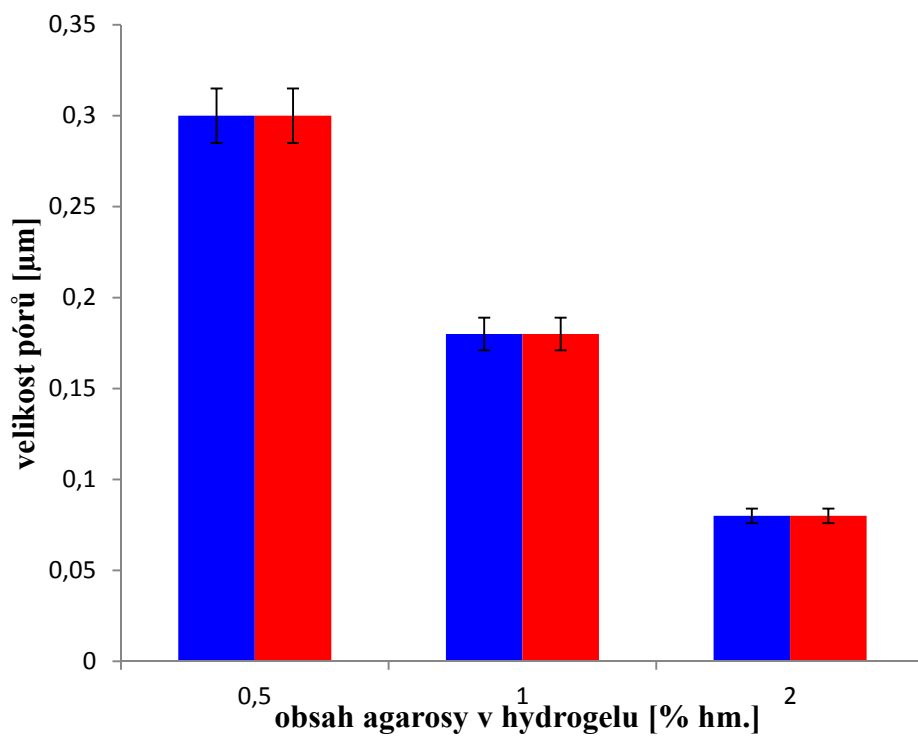




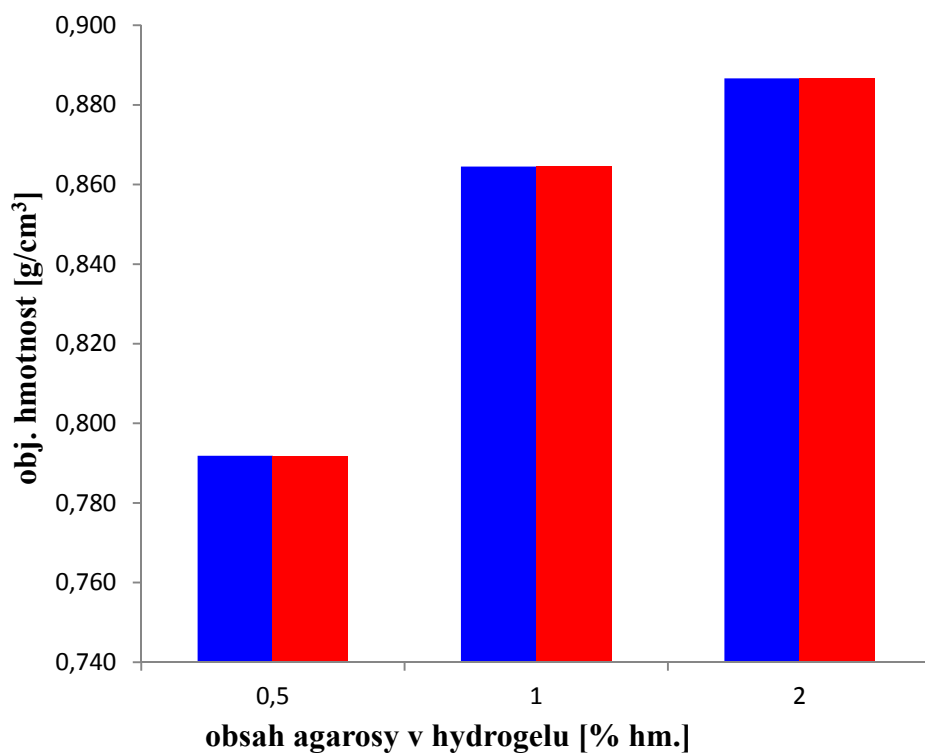
**Obrázek č. 17:** Závislost podílu efektivního difúzního koeficientu a zdánlivého difúzního koeficientu na obsahu agarózy v hydrogelu



**Obrázek č. 18:** Závislost koncentrace barviva v gelu na obsahu agarózy v hydrogelu



**Obrázek č. 19:** Závislost velikosti pórů na obsahu agarózy v hydrogelu



**Obrázek č. 20:** Závislost objemové hmotnosti na obsahu agarózy v hydrogelu

## 6 ZÁVĚR

Cílem mé bakalářské práce bylo charakterizovat gel, co se týče průměrné velikosti pórů a stanovit hodnotu difúzních koeficientů a dalších parametrů difúze difúzními experimenty. Oba cíle práce byly splněny.

V obou případech byly připraveny tři různě koncentrované roztoky AG hydrogelu o koncentracích ( $c = 0,0005 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ), ( $c = 0,001 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ) a ( $c = 0,002 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ), které byly následně podrobeny zkoumání pomocí obou metod, jak UV-VIS SPEKTROFOTOMETRIE (stanovení velikosti pórů), tak metodě difúzních cel (difúzní parametry).

Gel se nám podařilo charakterizovat metodou UV-VIS SPEKTROFOTOMETRIE, kde výstupem byly hodnoty absorbance, přepočítané na hodnoty transmitance. Následně byl vynesena graf závislosti  $\log(\tau)$  na  $\log(\lambda)$ , z jehož rovnice regrese jsme dostali vlnový exponent. Průměrná velikost pórů v různě koncentrovaném AG hydrogelu byla stanovena pomocí Aymardova grafu, podle předem získaného vlnového exponentu. Tato velikost byla nejvyšší pro nejméně koncentrovaný 0,5% AG hydrogel a jednalo se o velikost  $0,30 \text{ } \mu\text{m}$ . S rostoucí koncentrací tzn. pro 1% AG hydrogel se jednalo o hodnotu  $0,18 \text{ } \mu\text{m}$  a pro nejkonzentrovanejší 2% AG hydrogel byla velikost pochopitelně nejmenší  $0,08 \text{ } \mu\text{m}$ .

V další části práce byl zkoumán vliv struktury a obecně příprava AG hydrogelu na hodnoty difúzních parametrů. Ty byly změřeny pro dvě organická barviva rhodamin (RH) a methylenovou modř (MM), které se liší svou molekulovou hmotností (M). Tato barviva procházela různě koncentrovaným AG hydrogelem, což se pochopitelně projevilo na samotných difúzních parametrech. U obou barviv bylo prokázáno, že hodnota efektivního difúzního koeficientu ( $D_{eff}$ ) i zdánlivého difúzního koeficientu ( $D_a$ ) roste s klesající koncentrací AG v hydrogelu. Pro organické barvivo rhodamin, procházející nejméně koncentrovaným 0,5% AG hydrogelem byla stanovena nejvyšší hodnota jak  $D_{eff} = 2,14 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ , tak i hodnota  $D_a = 4,71 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  a nejnižší celkový čas difúze  $t_{průřich} = 3,05 \text{ hod}$ . Pro MM procházející takto koncentrovaným AG hydrogelem byly stanovené hodnoty difúzních koeficientů menší. Hodnota efektivního difúzního koeficientu činila  $D_{eff} = 1,81 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  a zdánlivého difúzního koeficientu  $D_a = 4,22 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ . Logicky celkový čas difúze vyšel pro MM větší  $t_{průřich} = 3,40 \text{ hod}$ . S rostoucí koncentrací AG v hydrogelu se difúzní koeficienty pro obě barviva zmenšovaly a časy průchodu difúze se zvětšovaly. Nejdéle probíhala difúze RH skrze nejkonzentrovanejší 2% AG hydrogel  $t_{průřich} = 6,03 \text{ hod}$  a tomu odpovídaly i nejnižší hodnoty difúzních koeficientů  $D_{eff} = 6,44 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  a  $D_a = 2,38 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ . Dále byl ještě stanoven rozdělovací koeficient pro obě barviva, který s rostoucí koncentrací AG v hydrogelu rostl. Jeho hodnota vyšla nejvyšší pro organické barvivo RH procházející 2% AG hydrogelem  $\varepsilon = 8,41$ . Koncentrace barviva v gelu, která jevila naprosto stejný trend vyšla nejvyšší pro organické barvivo MM procházející 2% AG hydrogelem  $c_{barviva} = 0,064 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$  a objemová hmotnost, která se též s rostoucí koncentrací AG v hydrogelu zvětšovala, byla stanovena nejvyšší pro 2% AG hydrogel  $0,887 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ .

## 7 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] NOVÁK, J. P. Fyzikální chemie II. 1.vyd. Praha: VŠCHT Praha, 2001. ISBN 80-7080436-X.
- [2] BARTOVSKÁ, L., M. ŠÍŠKOVÁ Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav. 5. vyd. Praha: VŠCHT Praha, 2005. ISBN 80-708-0579-X.
- [3] POUCHLÝ, Julius. Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav. 3. vyd. Praha: VŠCHT Praha, 2008. ISBN 978-80-7080-674-6.
- [4] BARTOVSKÁ, L., M. ŠÍŠKOVÁ: Co je co v povrchové a koloidní chemii [online] Verze 1.0, 2005 [cit. 2012-04-25]. VŠCHT v Praze. Dostupné z: <[http://vydavatelství.vscht.cz/knihy/uid\\_ex-001/](http://vydavatelství.vscht.cz/knihy/uid_ex-001/)>.
- [5] wikiskripta.eu [online] Česky. Dostupný z WWW: <<http://www.wikiskripta.eu/index.php/Soubor:Agarosa.jpg>>.
- [6] DJABOUROV M, CLARK A H, ROWLANDS D W and Ross-Murphy S B 1989 Makromolekules 22, 180.
- [7] BOURNE, M. C. (1978). Texture profile analysis. Food Technology , 62–66 (July).
- [8] MEULLENET, J. F., CARPENTER, J. A., LYON, B. G., & LYON, C. E. (1997). Bicyclical instrument for assessing texture profile parameters and its relationship to sensory evaluation of texture. Journal of Texture Studies, 28, 101–118.
- [9] BREUIL, P., & MEULLENET, J. F. (2001). A comparison of free instrumental tests for predicting sensory texture profiles of cheese. Journal of Texture Studies, 32, 41–55.
- [10] MONTEJANO, J. G., HAMANN, D. D., & LANIER, T. C. (1985). Comparison of two instrumental methods with sensory texture of protein gels. Journal of Texture Studies, 16, 403–424.
- [11] MUNOZ, A. M. (1986). Development and application of texture reference scales. Journal of Sensory Studies, 1, 55–83.
- [12] LYON, C. E., LYON, B. G., DAVIS, C. E., & TOWNSEND, W. E. (1980). Texture profile analysis of patties made from mixed and flake-cut mechanically deboned poultry meat. Poultry Science, 59, 69–76.
- [13] MUNOZ, A. M. (1986). Development and application of texture reference scales. Journal of Sensory Studies, 1, 55–83.
- [14] FOEGEDING, E. A., BROWN, J., DRAKE, M. A., & DAUBERT, C. R. (2003). Sensory and mechanical aspects of cheese texture. International Dairy Journal, 13, 585–591.
- [15] BOURNE, M. C. (1975). Is rheology enough for food texture measurement? Journal of Texture Studies, 6, 259–262.

- [16] SHAMA, F., & SHERMAN, P. (1973b). Identification of stimuli controlling the sensory evaluation of viscosity, II. Oral methods. *Journal of Texture Studies*, 4, 111–118.
- [17] SHAMA, F., & SHERMAN, P. (1973a). Evaluation of some textural properties of foods with the Instron Universal Testing Machine. *Journal of Texture Studies*, 4, 344–353.
- [18] BOURNE, M. C. (1977). Compression rates in the mouth. *Journal of Texture Studies*, 8, 373–376.
- [19] BROWN, W. E., EVES, D., ELLISON, M., & BRAXTON, D. (1998). Use of combined electromyography and kinesiobiology during mastication to chart the oral breakdown of foodstuffs: Relevance to measurement of food texture. *Journal of Texture Studies*, 29, 145–167.
- [20] ZIMM, BRUNO H. a S.D. LEVENE. Problems and prospects in the theory of gel electrophoresis of DNA. *Quarterly Reviews of Biophysics*. 1992, vol. 25, issue 02, s. 171-. DOI: 10.1017/S0033583500004662.
- [21] VIOVY, J. L. a S. D. LEVENE. Electrophoresis of DNA and other polyelectrolytes: Physical mechanisms. *Reviews of Modern Physics*. 2000, vol. 72, issue 3, s. 813-872. DOI: 10.1103/RevModPhys.72.813.
- [22] SAMBROOK, J. a D. W. RUSSELL. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd. ed. New York: Cold spring harbor laboratory press, 2001, 3 sv. (různé stránkování). ISBN 978-0-87969577-4.
- [23] *Electrophoresis*. 1983, vol. 4, issue 6. ISBN 0173-0835.
- [24] ROCHAS, C., and LAHAYE, M. (1989) Carbohydrate Polymers 10: 289-298
- [25] WISNIAK, J. a T. Graham. II. Contributions to diffusion of gases and liquids, colloids, dialysis, and osmosis. *Educación Química*[online]. 2013, vol. 24, s. 506-515 [cit. 2015-04-21]. DOI: 10.1016/s0187-893x(13)72521-7.
- [26] Diffusion Processes, T. Graham Symposium, ed. J.N. SHERWOOD, A.V.CHADWICK, W.M.MUIR, F.L. SWINTON, GORDON and BREACH, London, 1971, Vol.1, PagesVI-VII.
- [27] From E.A. MASON, *ibid*, pages 3-27.
- [28] J. FOURIER, *Théorie analytique de la CHALEUR*, F. D. PÉRE et fils, Paris,1822. Fac simile, E. J. GABAY, Paris 1988.
- [29] W. C. R. AUSTEN, Bakerian Lecture on the Diffusion in Metals, *Philos. Trans. Royal Soc. London*, A187 (1896). Part I, Diffusion of molten Metals, pages 383-403 Part II, Diffusion of solid Metals, pages 404-415.
- [30] R. BROWN, *Phil. Mag.* 4, 161. (1828).
- [31] G. GAMOW, *One, Two, Three...Infinity*, The Viking Press, New-York.
- [32] A. EINSTEIN, *Investigations on the Theory of the Brownian Movement*, edited with notes by R. Fürth, Dover publications,(1956).
- [33] J. PERRIN, *Les Atomes*, 1ère éd Paris (1913), 2de éd., Paris, Alcan (1936).

- [34] DOJČANSKÝ, J. Chemické inžinierstvo II. Bratislava: Malé centrum, 1999, 392 s. ISBN 80-967-0648-9.
- [35] ATKINS, P. a J. D. PAULA. Atkins' Physical chemistry. 8th ed. Oxford: Oxford University Press, 2006, 1064 s. ISBN 01-987-0072-5
- [36] CUSSLER, E. Diffusion: mass transfer in fluid systems. 3rd ed. New York: Cambridge University Press, 2009, 631 s. ISBN 05-218-7121-2.
- [37] KALINA, M. Využití průtokové coulometrie ve studiu transportu kovových iontů v huminových gelech. Brno, 2010. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce Ing. Martina Klučáková, Ph.D.
- [38] SEDLÁČEK, P. Hydrogely huminových kyselin - experimentální i aplikační forma. Brno, 2009. Dizertační práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce Ing. Martina Klučáková, Ph.D.
- [39] J. CRANK, The Mathematics of Diffusion, Oxford University Press, Oxford, 1975.
- [40] ROBINSON, R.A., STOKES, R.H., 1959. Electrolyte Solutions, 2nd ed. Butterworths scientific publications, London.
- [41] CRANK, J., 1975. The Mathematics of Diffusion, 2nd ed. Clarendon Press, Oxford, England.
- [42] B.A. WESTRIN, Diffusion Measurements in Gels. A Methodological Study, Ph.D. Thesis, Chemical Engineering, Lund University, Lund, Sweden, 1991.
- [43] SHACKELFORD, C. D., 1991. Laboratory diffusion testing for waste disposal - a review. Journal of Contaminant Hydrology 7 (3), 177–217.
- [44] SHACKELFORD, C. D. 1988b. Diffusion of inorganic chemical wastes in compacted clay.  
Ph.D. Dissertation, University of Texas, Austin, Texas.
- [45] LI, Y.-H., G, S., 1974. Diffusion of ions in sea water and in deep-sea sediments Geochimica et Cosmochimica Acta 38 (5), 703–714.
- [46] HLAVÁČ, J. : Základy technologie silikátů, SNTL Praha 1988, str.13-25.
- [47] SHACKELFORD, C. D., 1993. In: Daniel, D.E. (Ed.), Contaminant Transport (Chapter 3). Geotechnical Practice for Waste Disposal. Chapman and Hall, London, pp. 33–65.
- [48] PEARSON, F.J., 1999. In: APLIN, A.C., FLEET, A.J., MACQUAKER, J.H.S. (Eds.), What is the porosity of mudrock? Muds and Mudstones: Physical and Fluid Flow Properties. The Geological Society of London, London, pp. 9–21.
- [49] MALUSIS, M.A., SHACKELFORD, C.D., 2002a. Coupling effects during steady-state diffusion in a semipermeable membrane. Environmental Science & Technology 36 (6), 1312–1319.
- [50] PORTER, L.K., KEMPER, W.D., JACKSON, R.D., STEWART, B.A., 1960. Chloride diffusion in soils as influenced by moisture content. Soil Science Society of America, Proceedings 24 (6), 400–403.

- [51] SKAGIUS, K., NERETNIEKS, I., 1986. Porosities and diffusivities of some nonsorbing species in crystalline rocks. *Water Resources Research* 22 (3), 389–398
- [52] VAN LOON, L.R., SOLER, J.M., BRADBURY, M.H., 2003. Diffusion of HTO,  $^{36}\text{Cl}^-$  and  $^{125}\text{I}^-$  in Opalinus Clay samples from Mont Terri: effect of confining pressure. *Journal of Contaminant Hydrology* 61 (1–4), 73–83.
- [53] R.B. BIRD, W.E. STEWART, E.N. Lightfoot, *Transport Phenomena*, Wiley, New York, 1960.
- [54] E.L. CUSSLER, *Diffusion. Mass Transfer in Fluid Systems*, Cambridge University Press, Cambridge, 1997.
- [55] R.L. FOURNIER, *Basic Transport Phenomena in Biomedical Engineering*, Taylor & Francis, London, 1999 (Chapter 2).
- [56] J.C. BOSMA, J.A. WESSELINGH, Partitioning and diffusion of large molecules in fibrous structures, *J. Chromatogr. B* 743 (2000) 169–180.
- [57] H. FAXÉN, Die bewegung einer Starren Kugel längs der Achse eines mit zäher Flüssigkeit gefüllten Rohres, *Ark. Mat. Astron. Fys.* 17(1923) 1–28.
- [58] C. MATTISSON, P. ROGER, B. JONSSON, A. AXELSSON, G. ZACCHI, Diffusion of lysozyme in gels and liquids. A general approach for determinativ of diffusion coefficients using holographic laser interferometry, *J.Chromatogr. B* 743 (2000) 151–167.
- [59] J.A. WESSELINGH, R. KRISHNA, *Mass Transfer in Multicomponent Mixtures*, Delft University Press, Delft, 2000.
- [60] CRANK, J. *The mathematics of diffusion*. 2nd ed., 1st publ. in paperback 1979. Oxford: Oxford University Press, c1975, 414 s. Oxford science publications. ISBN 978-0-19-853411-2.
- [61] CUSSLER, E.L. *Diffusion: Mass Transfer in fluid systems*, Cambridge University Press, Cambridge, 1984.
- [62] GARCÍA, M., T. MISSANA a M. MINGARRO. Overview of laboratory methods employed for obtaining diffusion coefficients in FEBEX compacted bentonite. *Journal of Iberian Geology*. 2006, roč. 32, s. 127-137.
- [63] MOORE, S. M., Shackelford, C.D., 2011. Uranium diffusion in soils and rocks. and Mine Waste '11, Proceedings of the 15th International Conference on Tailings and Tailings Mine Waste, Vancouver, B.C., November 6–9, 2011. Norman B. Keevil Institute of Mining Engineering, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada, pp. 549–561.
- [64] KOTINGOVÁ, L., BORSKÁ, L., FIALA, Z.: Testování transdermální absorpce chemických látek *in vitro*.
- [65] YAMAGUCHI, T., SAKAMOTO, Y., NAKAYAMA, S., VANDERGRAAF, T., Effective diffusivity of the uranyl ion in a granite from Inada, Ibaraki, Japan. *Contaminant Hydrology*, 1997, vol. 26, p. 109–117.

- [66] YAMAGUCHI, T., NAKAYAMA, S.: Diffusivity of U, Pu and Am carbonate complexes in a granite from Inada, Ibaraki, Japan studied by through diffusion. *Contaminant Hydrology*, 1998, vol. 35, p. 55–65
- [67] Stanovení difúzních koeficientů metodou difúzní cely. *Chempoint* [online]. 2012 [cit. 2015-04-11]
- [68] PACÁK J.: Úvod do studia organické chemie. SNTL, Praha, Str. 173-177, (1982)
- [69] PACÁK J.: Poznáváme organickou chemii. SNTL, Praha, Str. 236-237, (1989)
- [70] R. RIGLER, J. WIDENGREN, Ü. METS, in: Wolfbeis (Ed.), *Fluorescence Spectroscopy*, Springer, 1992, p. 13.
- [71] R.A. KELLER, W.P. AMBROSE, P.M. GOODWIN, J.H. JETT, J.C. MARTIN, M. Wu, *Appl. Spectroscopy* 50(7) (1996) 12A.
- [72] D.L. TAYLOR, A.S. WAGGONER, R.F. MURPHY, F. LANNI, R.R. BIRGE (Eds.), *Applications of Fluorescence in the Biomedical Sciences*, Alan R. Liss Inc., New York, 1986.
- [73] K.H. DREXHAGE, in: F. P. SCHAFER (Ed.), *Dye Lasers*, Springer, Berlin-Heidelberg.
- [74] O.G. PETERSON, in: C.L. TANG (Ed.), *Methods of Experimental Physics*, Academic Press, New York, 1979.
- [75] F.J. DUARTE, L.W. HILLMANN (Eds.), *Dye Laser Principles*, Academic Press, New York, 1990.
- [76] J.B. MARLING, J.H. HAWLEY, E.M. LISTON and W.B. GRANT, *Lasing Characteristics of Seventeen Visible-Wavelength Dyes using a Coaxial- Flashlamp p-Pumped Laser Appl. Optics*, 13(10), 2317 (1974). a. With Rhodamine 6G
- [77] ZHANG, L, et al. Development of Rhodamine Dyes for Biochemical Application. Dostupné z: <http://finechem.dlut.edu.cn>
- [78] GLUSKO CA, PREVITALI CM, Vera DMA, Chesta CA, Montejano HA. An experimental and theoretical study on the photophysical properties of methylene green. *Dye Pigment* 2011;90:28e35.
- [79] ORTIZ M, FRAGOSO A, ORTIZ PJ, O'SULLIVAN CK. Elucidation of the mechanism of single-stranded DNA interaction with methylene blue: a spectroscopic approach. *J Photochem Photobiol A Chem* 2011;218:26e32
- [80] SAMPROVALAKI, K., P.T. ROBBINS a P.J. FRYER. 2012. Investigation of the diffusion of dyes in agar gels. *Journal of Food Engineering*. 111(4): 537-545. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2012.03.024.
- [81] SAMPROVALAKI, K., P.T. ROBBINS a P.J. FRYER. 2012. A study of diffusion of dyes in model foods using a visual method. *Journal of Food Engineering*. 110(3): 441-447. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2011.12.023.
- [82] SEDLÁČEK, P., J. SMILEK a M. KLUČÁKOVÁ. 2013. How the interactions with humic acids affect the mobility of ionic dyes in hydrogels – Results from diffusion cells: the origin, evolution, and impact of doi moi. *Reactive and*



- Functional Polymers. 73(11): 1500-1509. DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2013.07.008.
- [83] NICHOLSON, C, J M PHILLIPS a K. J. WILKINSON. 1981. Ion diffusion modified by tortuosity and volume fraction in the extracellular microenvironment of the rat cerebellum: the origin, evolution, and impact of doi moi. The Journal of Physiology. 321(1): 225-257. DOI: 10.1113/jphysiol.1981.sp013981.
- [84] GOLMOHAMADI, M., T. A. DAVIS a K. J. WILKINSON. 2012. Diffusion and Partitioning of Cations in an Agarose Hydrogel. The Journal of Physical Chemistry A. 116(25): 6505-6510. DOI: 10.1021/jp212343g.

## 8 SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

### 8.1 Použité symboly

<i>Symbol</i>	<i>Význam symbolu</i>	<i>Jednotka</i>
$J_1$	difúzní tok	$\text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$
$A$	plocha	$\text{m}^2$
$D_a$	zdánlivý difúzní koeficient	$\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$
$D_{eff}$	efektivní difúzní koeficient	$\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$
$\varphi$	pórovitost	$\mu\text{m}$
$\theta$	objemová vlhkost	%
$\cap$	tortuozita	%
$C$	koncentrace	$\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$
$K_d$	distribuční koeficient	%
$K_b$	Boltzmanova konstanta	$\text{J} \cdot \text{K}^{-1}$
$\eta$	dynamická viskozita	$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$
$R_s$	Stokesův poloměr	$\text{mm}$
$M$	molekulová hmotnost	$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$
$\rho$	hustota	$\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$
$u$	chemický potenciál	$\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$
$l$	tloušťka filmu	$\text{mm}$
$c_{10}$	neměnná koncentrace	$\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$
$\sqrt{4 \cdot D_a t}$	difúzní délka	$\text{s}$
$n_1$	suma látky	$\text{g}$
$\tau$	transmitance	%
$x$	vzdálenost	$\text{m}$
$T$	teplota	$\text{K}$
$w$	práce	$\text{J}$
$p$	tlak	$\text{Pa}$

$\xi$	odchylka	%
$T_m$	maticový faktor tortuozity	
$R_d$	retardační faktor	
$erfc$	doplňková chybová funkce	
$A$	absorbance	
$\varepsilon$	rozdělovací koeficient	

## 8.2 Použité zkratky

AG	agaróza
RH	rhodamin
MM	methylenová modř
UV	ultrafialová oblast spektra elektromagnetického záření
VIS	viditelná oblast spektra elektromagnetického záření
EEO	elektroendoosmóza